



Universidade de Aveiro
2011

Departamento de Biologia

**Nélia Maria Pinto
de Oliveira**

BIOSENSOR PARA DETEÇÃO DO ANTIGÉNIO ESPECÍFICO DA PRÓSTATA

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Simone Barreira Morais, Professora Adjunta do Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP) e co-orientação da Professora Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira, Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro. O procedimento prático deste trabalho foi realizado no laboratório REQUIMTE/ISEP.

Dedico este trabalho à minha mãe e a todas as vítimas de cancro que pelo sofrimento e ao mesmo tempo a coragem com que lidam com esta doença nos motivam para trabalhos como este!

O júri

Presidente

Doutora Gabriela Maria Ferreira Ribeiro de Moura

Investigadora Auxiliar do CESAM da Universidade de Aveiro

Doutor Subramanian Viswanathan

Investigador Auxiliar do REQUINTE do Instituto Superior de Engenharia do Porto

Professora Doutora Simone Barreira Moraes

Professora Adjunta do Instituto Superior de Engenharia do Porto

Professora Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira

Professora Associada com Agregação da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

À Professora Doutora Simone Morais pela ideia deste projecto maravilhoso e por todas as sugestões e críticas dadas durante a execução do trabalho.

À Professora Doutora Maria de Lourdes Pereira pela co-orientação e por toda a disponibilidade mostrada durante o trabalho.

Ao Doutor Subramanian Viswanathan pelo imprescindível apoio prestado durante a execução do trabalho. Os seus conhecimentos tornaram possível a realização prática deste projecto.

À Professora Doutora Cristina Matos por ter permitido e facilitado a utilização do laboratório REQUIMTE.

A todos os colaboradores do laboratório REQUIMTE pelo auxílio e ambiente fantástico de trabalho que me proporcionaram.

À minha família e amigos pelo apoio, compreensão e paciência que revelaram ao longo destes últimos meses.

“Os caminhos que conduzem o homem ao saber são tão maravilhosos quanto o próprio saber”

(Johannes Kepler - Astrônomo alemão)

Palavras-chave

imunossensor, carcinoma da próstata, antígeno específico da próstata, anticorpo monoclonal para PSA, nanopartículas de ouro, monocamada auto-organizada.

Resumo

O antígeno específico da próstata (PSA) é um valioso biomarcador tumoral sendo útil no rastreio, diagnóstico, estadiamento e monitorização do carcinoma da próstata. Para a determinação deste antígeno, os biossensores surgem como uma técnica muito atrativa devido à sua simplicidade, portabilidade, rápida e sensível análise em tempo real quando comparados com as técnicas convencionais dos equipamentos automatizados. Neste estudo, foi desenvolvido um imunossensor eletroquímico para a detecção do antígeno específico da próstata. Os anticorpos monoclonais para o antígeno específico da próstata foram imobilizados através de nanopartículas de ouro adsorvidas na superfície de um eletrodo de ouro. Esta superfície foi previamente modificada com monocamada auto-organizada de hexanoditiol. A especificidade da ligação entre o anti-PSA e o PSA foi suficiente para bloquear proporcionalmente a transferência eletrônica, permitindo obter uma curva de calibração entre os 0,200 e os 5000 ng ml⁻¹ de PSA com um limite de detecção de 10 pg ml⁻¹. Os resultados obtidos possibilitaram o doseamento do PSA provando-se a viabilidade da aplicação de imunossensores eletroquímicos com detecção direta para o antígeno específico da próstata.

Keywords

immunosensor, prostate cancer, prostate specific antigen, monoclonal antibody to PSA, gold nanoparticles, self-assembled monolayer.

Abstract

Prostate specific antigen (PSA) is a valuable tumor biomarker useful in screening, diagnosis, staging and monitoring on prostate cancer. In the detection of this antigen, biosensors appear as a very attractive technique due their simplicity, portability, rapid and sensitive real-time analysis compared with conventional techniques on automated devices. In this study, an electrochemical immunosensor was developed for detection of prostate-specific antigen. Monoclonal antibodies of prostate specific antigen were immobilized through gold nanoparticles adsorbed in gold electrode surface. This surface was previously modified with a self-assembled monolayer of hexanodithiol. The binding specificity between anti-PSA and PSA was enough to block proportionally the electron transfer allowing to obtain a calibration curve for PSA in the range of 0,200 to 5000 ng ml⁻¹ with a detection limit of 10 pg ml⁻¹. The results demonstrated the reliable application of electrochemical immunosensors for direct detection of prostate-specific antigen.

ÍNDICE

1. ENQUADRAMENTO	Pág.1
2. INTRODUÇÃO	
2.1. Carcinoma da próstata	Pág.2
2.1.1. Antígeno específico da próstata	
2.1.1.1. Bioquímica e biosíntese	Pág.11
2.1.1.2. Biomarcador tumoral	Pág.13
2.2. Biossensores	Pág.15
2.2.1. Classificação de biossensores	Pág.16
2.2.1.1. Classificação baseada nos bioreceptores	Pág.16
2.2.1.2. Classificação baseada no tipo de transdutor	Pág.19
2.2.2. Voltametria	Pág.20
2.2.3.1. Voltametria cíclica	Pág.23
2.2.3.2. Voltametria de onda quadrada	Pág.24
2.2.3. Imobilização de biomoléculas em biossensores	Pág.26
2.2.4.1. Monocamadas auto-organizadas	Pág.28
2.2.4. A nanotecnologia no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos	Pág.31
2.2.4.1. Nanopartículas de ouro	Pág.31

2.2.5. Biossensores para o PSA- estado da arte	Pág.32
------------------------------------------------	--------

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes e soluções	Pág.35
3.2. Equipamento	Pág.35
3.3. Procedimentos experimentais	
3.3.1. Limpeza dos elétrodos	Pág.37
3.3.2. Estudo de diferentes monocamadas auto-organizadas	Pág.38
3.3.3. Preparação de nanopartículas de ouro	Pág.38
3.3.4. Imobilização dos anticorpos nos elétrodos de ouro	Pág.39
3.3.5. Incubação com o antígeno específico da próstata	Pág.39
3.3.6. Reutilização dos elétrodos	Pág.40

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Pré-tratamento da superfície do ouro	Pág.41
4.2. Determinação da área real do eléctrodo de ouro	Pág.42
4.3. Caracterização das monocamadas auto-organizadas	Pág.42
4.3.1. Otimização do tempo de imersão de eléctrodo de ouro em SAM de hexanoditiol	Pág.45
4.4. Nanopartículas de ouro	Pág.46
4.4.1. Estudos espectrofotométricos	Pág.47
4.4.2. Estudos voltamétricos	Pág.48
4.5. Imobilização do anti-PSA	Pág.50

4.5.1. Bloqueio de remanescentes locais reativos das nanopartículas de ouro	Pág.52
4.6. Detecção do antigénio específico da próstata	Pág.53
5. CONCLUSÃO	Pág.61
6. BIBLIOGRAFIA	Pág.63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Localização da glândula prostática no sistema reprodutor masculino (1).	Pág.2
Figura 2- Incidência e mortalidade do cancro no mundo em 2008 na população masculina. Dados do projeto GLOBOCAN 2008 da <i>International Agency for Research on Cancer</i> (2).	Pág.3
Figura 3- Incidência do cancro da próstata no mundo em 2008. Dados do projeto GLOBOCAN 2008 da <i>International Agency for Research on Cancer</i> (2).	Pág.4
Figura 4- Incidência e mortalidade do cancro em Portugal em 2008 na população masculina. Dados do projeto GLOBOCAN 2008 da <i>International Agency for Research on Cancer</i> (2).	Pág.5
Figura 5- Anatomia da glândula prostática (1).	Pág.6
Figura 6- Estrutura das diferentes isoformas do PSA (8).	Pág.11
Figura 7- Proteólise do PSA. A figura indica as posições onde a forma ativa do PSA pode ser ainda clivada para gerar formas de PSA inativo (8).	Pág.12
Figura 8- Modelo da biosíntese do PSA no epitélio prostático normal <i>versus</i> carcinoma da próstata (8).	Pág.12
Figura 9- Representação geral de um biossensor (17).	Pág.16
Figura 10- Representação esquemática de uma célula eletroquímica com três eléctrodos: eléctrodo de trabalho (WE); eléctrodo de referência (RE); eléctrodo auxiliar (CE.)	Pág.21
Figura 11- Sinal de excitação em voltametria cíclica (31).	Pág.23
Figura 12- Voltamograma cíclico típico para sistema reversível (31).	Pág.24

Figura 13- Esquema de aplicação do potencial e medição da intensidade de corrente ao longo do tempo na voltametria de onda quadrada (32). **Pág.25**

Figura 14- Voltamograma esquemático de onda quadrada para um processo de oxidação-redução reversível (33). **Pág.25**

Figura 15- Representação esquemática de compostos orgânicos de enxofre usados na formação de monocamadas auto-organizadas em superfícies de ouro: (a) alcanotiol, (b) dialquildissulfeto (c) dialquilsulfeto (40). **Pág.29**

Figura 16- Formação de monocamadas auto-organizadas no ouro (41). **Pág.29**

Figura 17- Representação de um alcanotiol sobre a superfície do ouro (42). **Pág.30**

Figura 18- Mudança na coloração de uma suspensão de nanopartículas devido ao processo de agregação. **Pág.32**

Figura 19- Potencióstato/Galvanóstato PSTAT 12 (AUTOLAB, EcoChimie). **Pág.36**

Figura 20- Montagem eletroquímica usada. **Pág.36**

Figura 21- Voltamograma cíclico típico de eletrodo de ouro em solução aquosa de H_2SO_4 0,5 mol/dm³ a uma velocidade de varrimento 100 mV/s. **Pág.41**

Figura 22- Comparação entre diferentes voltamogramas de onda quadrada para eletrodo de ouro sem modificação (Au) e após modificação com diferentes monocamadas auto-organizadas: SAM de cistamina (CYS); SAM mista de cistamina e mercaptoetanol (CYS+ME); SAM mista de ácido mercaptopropiónico e mercaptoetanol (MPA+ME); SAM de ácido mercaptopropiónico (MPA) e SAM de 1,6-hexanoditiol (HDT). Perfis obtidos em solução PBS 0,1 mol/dm³ pH=7,4 contendo 0,01 mol/dm³ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ usando uma velocidade de varrimento 0,199 V/s. **Pág.44**

Figura 23- Perfis voltamétricos de onda quadrada obtidos para eletrodo de ouro modificado com cistamina (CYT) e após imobilização com BSA. Célula eletroquímica com solução PBS 0,1 mol/dm³ pH=7,4 contendo 0,01 mol/dm³ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$; velocidade de varrimento 0,199 V/s. **Pág.45**

Figura 24- Voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes tempos de imersão do eletrodo de ouro em solução de hexanoditiol. Célula eletroquímica com solução PBS 0,1 mol/dm³ pH=7,4 contendo 0,01 mol/dm³ K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆]; velocidade de varrimento 0,199 V/s. **Pág.46**

Figura 25- Análise por espectrofotometria no UV- visível para solução de nanopartículas de ouro. **Pág.48**

Figura 26- Modificação de eletrodo de ouro com SAM de hexanoditiol e nanopartículas de ouro (60). **Pág.49**

Figura 27- Voltamogramas cíclicos obtidos em eletrodo de ouro modificado com SAM de hexanoditiol (HDT) e após imersão em nanopartículas de ouro (Au-NPs). Célula eletroquímica com solução PBS 0,1 mol/dm³ pH=7,4 contendo 0,01 mol/dm³ K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆]; velocidade de varrimento 0,05 V/s. **Pág.50**

Figura 28- Representação esquemática da imobilização de anticorpos IgG em eletrodo de ouro (60). **Pág.51**

Figura 29- Intensidade de corrente do pico catódico obtida com o eletrodo de ouro modificado com diferentes concentrações de anti-PSA (voltamogramas obtidos em célula eletroquímica com solução PBS 0,1 mol/dm³ pH=7,4 contendo 0,01 mol/dm³ K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆]; velocidade de varrimento 0,199 V/s. **Pág.51**

Figura 30- Modificação de eletrodo de ouro com SAM de hexanoditiol/nanopartículas de ouro/ anti-PSA/BSA. **Pág.52**

Figura 31- Voltamogramas de onda quadrada obtidos em eletrodos de ouro modificados com HDT/Au-NPs/anti-PSA 10 µg/ml e após colocação de BSA. Célula eletroquímica com solução PBS 0,1 mol/dm³ pH=7,4 contendo 0,01 mol mol/dm³ K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆]; velocidade de varrimento 0,199 V/s. **Pág.53**

Figura 32- Esquema representativo do bloqueio de transferência de electrões após diferentes modificações do eléctrodo de ouro (60). **Pág.54**

Figura 33- Perfis voltamétricos obtidos para eletrodo modificado (HDT/Au-NPs/anti-PSA/BSA) e após colocação de diferentes concentrações de antígeno PSA (1 e 20 ng/ml). Célula eletroquímica com solução PBS 0,1 mol/dm³ pH=7,4 contendo 0,01 mol/dm³ K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆]; velocidade de varrimento 0,199 V/s.

Pág.55

Figura 34 -Voltamogramas cíclicos obtidos com diferentes modificações do eletrodo de ouro: **a)** eletrodo de ouro sem modificação; **b)** após colocação de HDT; **c)** após colocação de nanopartículas de ouro; **d)** após colocação de anti-PSA 10 µg/ml; **e)** após colocação de PSA 20 ng/ml. Célula eletroquímica com solução PBS 0,1 mol/dm³ pH=7,4 contendo 0,01mol/dm³ K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆]; velocidade de varrimento 0,05 V/s.

Pág.56

Figura 35- Voltamogramas obtidos em diferentes tempos de imersão do eletrodo de ouro em solução de glicina ácida. PSA (c= 50 ng/ml); Anti-PSA (c= 10 µg/ml). Célula eletroquímica com solução PBS 0,1 mol/dm³ pH=7,4 0,01 mol/dm³ K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆]; velocidade de varrimento 0,199 V/s.

Pág.57

Figura 36- Perfis Voltamétricos de onda quadrada obtidos para diferentes concentrações de PSA em eletrodo de ouro modificado (HDT/Au-NPs/anti-PSA 10 µg/m). Célula eletroquímica com solução PBS 0,1 mol/dm³ pH=7,4 contendo 0,01 mol/dm³ K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆]; velocidade de varrimento 0.199 V/s

Pág.58

Figura 37- Curva de calibração de redução do pico de corrente (%) vs. a concentração de PSA (0,200-5000 ng/ml) obtida usando o imunossensor eletroquímico construído.

Pág.59

Figura 38- Regressão linear da redução do pico de corrente (%) vs. log [PSA] (0,200-200 ng/ml) usando o imunossensor eletroquímico construído

Pág.60

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Classificação TNM para o carcinoma da próstata (1).	Pág.7
Tabela 2- Valores de PSA ajustados à idade (1).	Pág.14
Tabela 3- Principais métodos de imobilização de biomoléculas em biossensores.	Pág.27
Tabela 4- Limitações dos testes convencionais para a detecção do PSA (47).	Pág.33
Tabela 5- Formatos de biossensores para a detecção do PSA desenvolvidos até 2007 (47).	Pág.33
Tabela 6- Resumo de estudos de 2008 a 2011 no desenvolvimento de biossensores para o PSA.	Pág.34

ABREVIATURAS

Ac-Anticorpo

ACT- α -1-antitripsina

ADN- ácido desoxirribonucleico

Ag- Antigénio

Au- ouro

Au-NPs- Nanopartículas de ouro

BSA- Albumina de soro bovino

CaP- Carcinoma da próstata

CV- Voltametria cíclica

CYS- Cistamina

HDT- Hexanoditiol

LOD- Limite de deteção

ME- Mercaptoetanol

MPA- Ácido mercaptopropiónico

PBS- Tampão fosfato salino

POP- Portal de Oncologia Português

PSA- Antigénio específico da próstata

SWV- Voltametria de onda quadrada

SAM- Monocamada auto-organizada

1.ENQUADRAMENTO DO TRABALHO

Os biomarcadores tumorais são macromoléculas presentes no tumor, no sangue ou noutros fluidos biológicos, cujo aparecimento e/ou alterações nas suas concentrações estão relacionadas com a génese e o crescimento de células neoplásicas. Estes biomarcadores são muito úteis no auxílio do diagnóstico da doença, na monitorização da mesma, na avaliação do tratamento e na deteção de recidiva. Normalmente, a deteção dos biomarcadores, nomeadamente aqueles que são detetados no sangue, são efetuados em aparelhos automatizados baseados nas técnicas *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Os biossensores, dispositivos compactos analíticos que integram um elemento biológico para o reconhecimento do analito em associação com um elemento transdutor que converte a resposta biológica num sinal eletrónico, têm surgido como uma ferramenta alternativa na deteção de moléculas biológicas, nomeadamente na deteção de biomarcadores tumorais, cujo doseamento é feito com elevada frequência. Características como o facto de serem pequenos, portáteis, de rápida e sensível análise em tempo real, económicos e serem práticos para o paciente, são vantagens em relação aos métodos tradicionais. Em relação ao doseamento do PSA sérico, já foram desenvolvidos alguns biossensores. No entanto, ainda nenhum dispositivo comercial foi apresentado de modo que o estudo de novos biossensores para este biomarcador, com características mais interessantes, ainda merece desenvolvimento.

2.INTRODUÇÃO

2.1. Carcinoma da próstata

A próstata é uma pequena glândula masculina com um peso aproximado de 20 g, responsável em produzir 40% a 50% dos fluídos que constituem o esperma. Esta glândula tem uma função biológica importante na fase reprodutora do homem uma vez que confere proteção e nutrientes fundamentais à sobrevivência dos espermatozoides.

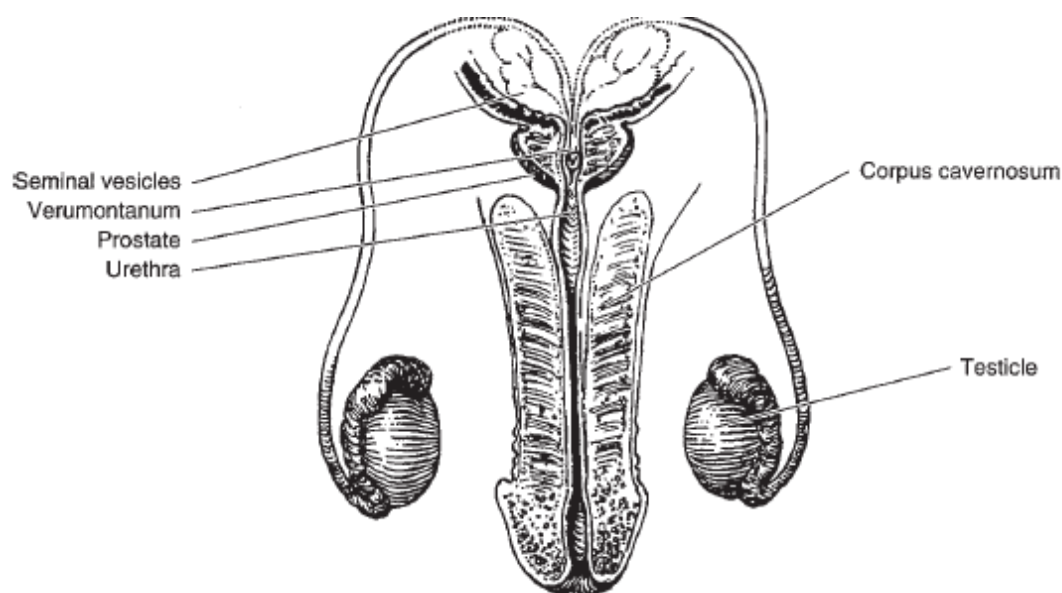


Figura 1- Localização da glândula prostática no sistema reprodutor masculino (1).

O carcinoma da próstata (CaP) é uma doença de grande relevância clínica em função da sua elevada incidência e das altas taxas de cura dos pacientes quando a doença é tratada precocemente. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a tendência da incidência desta doença está a aumentar, resultado da interligação de vários fatores, tais como a evolução dos meios de diagnóstico, o envelhecimento da população ou o aumento efetivo do número de novos casos. O cancro da próstata surge, agora, no mundo como o segundo tipo de cancro mais frequente nos homens (Figura 2), apesar de não ser dos mais mortais uma vez que, nos últimos

anos, o rastreio sistemático e o desenvolvimento de campanhas de diagnóstico precoce levaram a um aumento do número de casos diagnosticados em fases iniciais e, consequentemente, ao sucesso no tratamento da doença. As taxas de mortalidade têm vindo a diminuir desde meados da década de 90 (1).

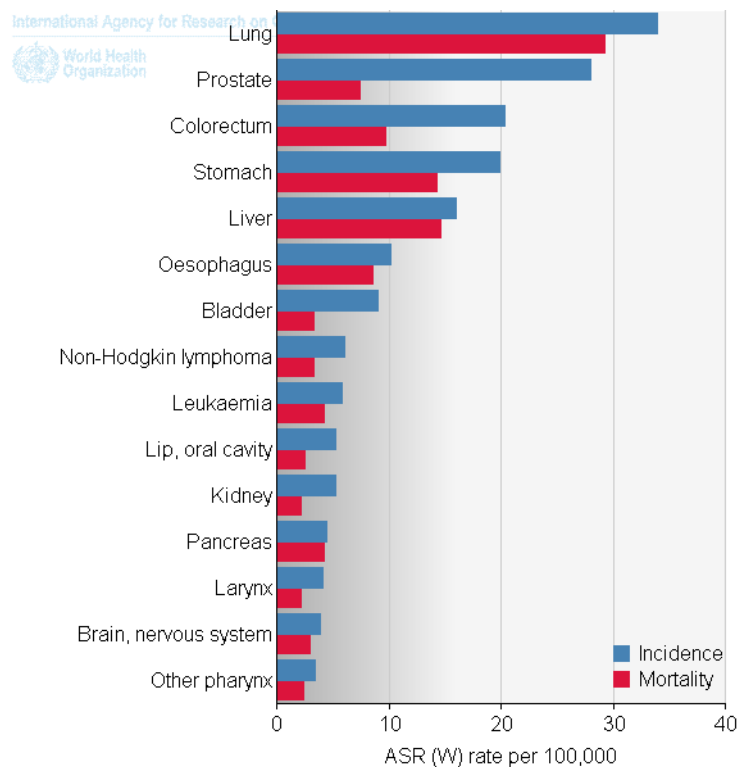


Figura 2- Incidência e mortalidade do cancro no mundo em 2008 na população masculina. Dados do projeto GLOBOCAN 2008 da *International Agency for Research on Cancer* (2).

A incidência geográfica deste carcinoma é extraordinariamente variável (Figura 3). A nível mundial, é muito frequente nos Estados Unidos da América (com particular destaque nos afro-americanos) e comparativamente bastante raro no Oriente (Japão e China). A nível Europeu, também existem assimetrias marcadas, sendo mais frequente nos países nórdicos. Na Europa, o cancro da próstata representa cerca de 12% de todos os cancros, sendo a segunda causa de morte por patologia oncológica nos homens.

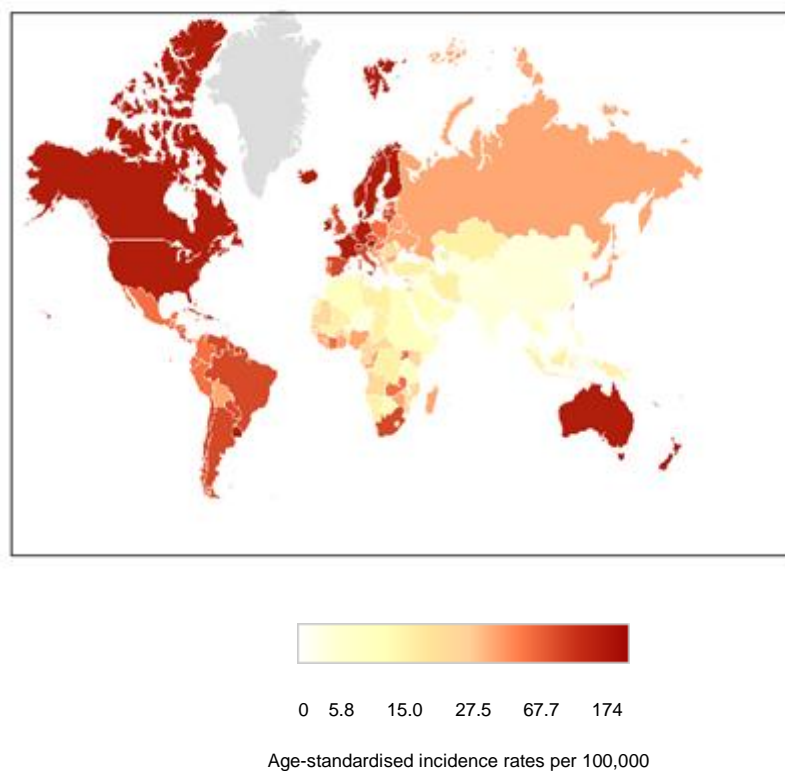


Figura 3- Incidência do cancro da próstata no mundo em 2008. Dados do projeto GLOBOCAN 2008 da *International Agency for Research on Cancer* (2).

Em Portugal, o cancro da próstata é o cancro mais frequente no homem sendo o número de novos casos estimados por ano de 4.000 com uma mortalidade aproximada de 1.800 doentes (3). O projeto Globocan (Figura 4) também confirma esta elevada frequência do cancro da próstata em Portugal, apesar de não ser o mais mortal.

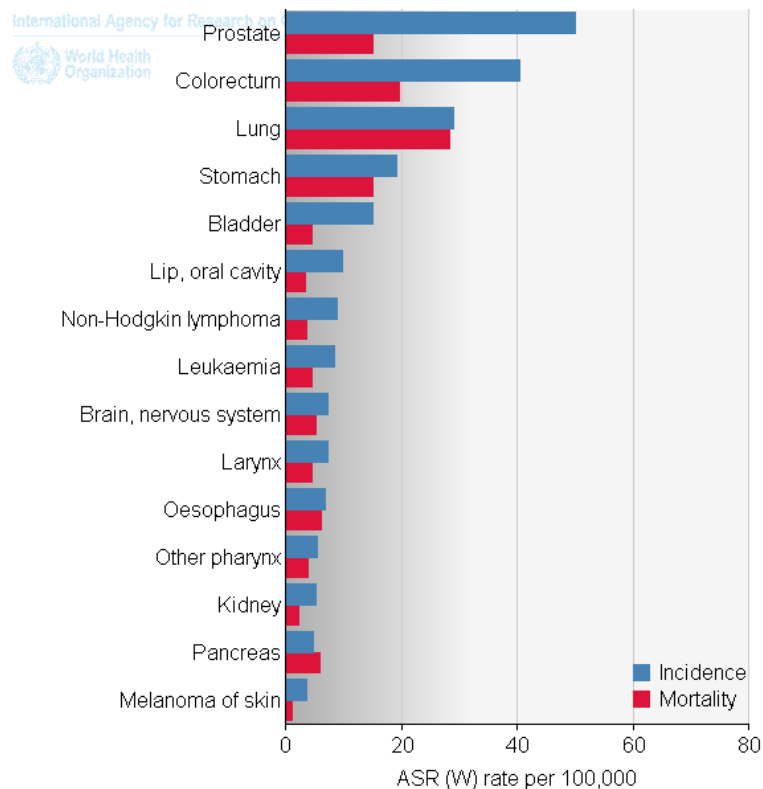


Figura 4-Incidência e mortalidade do cancro em Portugal em 2008 na população masculina. Dados do projeto GLOBOCAN 2008 da *International Agency for Research on Cancer* (2).

Apesar da etiologia indeterminada, existem vários fatores associados à promoção e início do carcinoma da próstata. A idade avançada e a história familiar são fatores de risco comprovados. O aumento da idade aumenta o risco para carcinoma da próstata. O facto da próstata sofrer um segundo crescimento por volta dos 50 anos (o primeiro crescimento acontece na puberdade) poderá ser um contributo, no entanto, desconhece-se o processo como o envelhecimento desencadeia a neoplasia. A probabilidade de CaP em um homem com idade inferior a 40 anos é de 1 em 10 000, para homens entre os 40-59 anos é de 1 em 103 e para homens entre os 60-79 anos de idade é de 1 em 8. A história familiar positiva para CaP aumenta o risco relativo para este carcinoma. A existência de um antepassado com CaP supõe um risco duas vezes superior ao da população em geral e, quanto mais cedo se iniciar a doença, maior será o risco. O principal proto-oncogene envolvido nos casos de história familiar é o HPC-I (*Hereditary Prostate Cancer I*). Outros genes implicados são os genes das proteínas p53, bcl-2 (biomarcadores de prognóstico), E-caderina, c-erb2, PTEN e gene dos recetores de androgénios. A incidência do

CaP é cerca de 70% maior em negros e 70% menor em orientais e índios quando comparada com a frequência em brancos. Fatores genéticos e

ambientais contribuem para esta diferença. Outros fatores de risco implicados no CaP são fatores dietéticos e fatores hormonais. As dietas ricas em gorduras saturadas e de elevado conteúdo proteico, as dietas “ocidentais” estão fortemente associadas a um risco maior para o desenvolvimento da doença. Estudos epidemiológicos e de migração revelam que em países com dietas com baixo teor de gordura baseadas em plantas apresentam menor incidência de CaP e, por conseguinte, quando existe um fluxo de migração para países ocidentalizados verifica-se um aumento do desenvolvimento da doença. O licopeno (betacaroteno natural precursor da vitamina A), o selênio e a vitamina E parecem ser fatores protetores desta doença. A testosterona está associada ao CaP, não propriamente na promoção da doença, mas na aceleração do crescimento tumoral quando já existe neoplasia (1,4).

O carcinoma da próstata desenvolve-se, na grande maioria dos casos, nas células glandulares (95% dos casos são adenocarcinomas). Os restantes 5% podem ser carcinomas de células transicionais (90%) e muito raramente podem tratar-se de carcinoma de pequenas células ou de um sarcoma. Os adenocarcinomas podem localizar-se na zona periférica (75%), na zona transicional (25%) ou na zona central (5%) da glândula prostática (Figura 5).

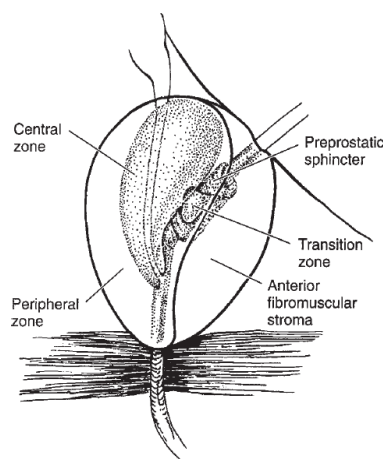


Figura 5- Anatomia da glândula prostática (1).

A diferenciação glandular nos casos de adenocarcinoma constitui um importante fator prognóstico, relacionando-se com o comportamento biológico do tumor e a sobrevida do paciente. A maior ou menor diferenciação tumoral relaciona-se com carcinomas menos ou mais agressivos, respetivamente. O grau histológico é dado pela classificação de Gleason. Este sistema valoriza o padrão glandular e o estroma prostático. Como os adenocarcinomas da próstata apresentam mais que um padrão histológico, o diagnóstico final na escala de Gleason é obtido pela soma dos graus do padrão primário (predominante) e do padrão secundário (segunda menor área representada), o que faz com que as neoplasias mais diferenciadas sejam classificadas com pontuação 2 (1+1) e as mais anaplásicas (mais agressivas) sejam caracterizadas com pontuação 10 (5+5).

A evolução dos pacientes com adenocarcinoma da próstata está intimamente relacionada com a extensão da neoplasia. O estadiamento clínico é fundamental para a orientação terapêutica. A classificação atualmente utilizada é a Classificação de tumores malignos da *Union for International Cancer Control* (Tabela 1).

Tabela 1- Classificação TNM para o carcinoma da próstata (1).

T—Primary tumor	
Tx	Cannot be assessed
T0	No evidence of primary tumor
Tis	Carcinoma in situ (PIN)
T1a	≤5% of tissue in resection for benign disease has cancer, normal DRE
T1b	>5% of tissue in resection for benign disease has cancer, normal DRE
T1c	Detected from elevated PSA alone, normal DRE and TRUS
T2a	Tumor palpable by DRE or visible by TRUS on one side only, confined to prostate
T2b	Tumor palpable by DRE or visible by TRUS on both sides, confined to prostate
T3a	Extracapsular extension on one or both sides
T3b	Seminal vesicle involvement
T4	Tumor directly extends into bladder neck, sphincter, rectum, levator muscles, or into pelvic sidewall
N—Regional lymph nodes (obturator, internal iliac, external iliac, presacral lymph nodes)	
Nx	Cannot be assessed
N0	No regional lymph node metastasis
N1	Metastasis in a regional lymph node or nodes
M—Distant metastasis	
Mx	Cannot be assessed
M0	No distant metastasis
M1a	Distant metastasis in nonregional lymph nodes
M1b	Distant metastasis to bone
M1c	Distant metastasis to other sites

DRE, digital rectal examination; PIN, prostatic intraepithelial neoplasia; PSA, prostate-specific antigen; TRUS, transrectal ultrasound.
Source: American Joint Committee on Cancer: *Cancer Staging Manual*, 5th ed. Lippincott-Raven, 1997.

Os tumores T1 e T2 são abordados de forma “agressiva”, com intuitos curativos dada a possibilidade de “cura” da doença. Os pacientes com tumores T4, N superior a 0 ou M superior a 0 são tratados com intenção de atrasar ou evitar a progressão da doença. Nos doentes com tumores T3 existe alguma controvérsia em relação à melhor forma de tratamento.

Em fases precoces, a grande maioria dos carcinomas da próstata são assintomáticos, sendo diagnosticados apenas pelos exames médicos, principalmente, pelo doseamento sérico do antígeno específico da próstata (PSA). Os sintomas sugestivos de doença localmente mais avançada são os habituais sintomas do aparelho urinário inferior (dificuldade de micção, jato urinário fraco, aumento do número de micções). Ocasionalmente, pode manifestar-se por hematúria, hematospermia ou disfunção erétil. Os sintomas de doença avançada são os sintomas causados pela doença metastática e as suas consequências: dor lombar, dores ósseas noutras localizações, perda de peso, astenia e fadiga. Tardamente, podem surgir sintomas de compressão medular causados pelas metástases vertebrais.

A evolução dos pacientes com cancro da próstata é relativamente imprevisível, com casos de rápida disseminação da neoplasia, antes mesmo de surgirem sintomas locais, e casos de evolução lenta e indolor, com lesões que permanecem estacionárias (4).

A Organização Mundial de Saúde (5) recomenda para a deteção do carcinoma da próstata a realização do toque retal (DRE), o doseamento sérico do antígeno específico da próstata (PSA) e a realização da ultrassonografia transrectal (TRUS). O toque retal fornece as características físicas da próstata e da existência de alterações suspeitas, como nódulos, áreas duras ou de maior consistência, assimetria e limites mal definidos. A palpação deve ser realizada de uma forma cuidadosa e é habitualmente efetuada em decúbito dorsal, com flexão da anca e joelhos. O doseamento do PSA é o exame fulcral para o diagnóstico do cancro da próstata. O valor normal “tradicional” é de 4 ng/ml, embora, em pacientes novos, alguns autores consideram como normal o valor limite de 2,5 ng/ml. A ultrasonografia trans-retal é essencial para a orientação e sistematização das biópsias da próstata. Não é muito útil como exame isolado mas, na presença de um toque retal ou valores elevados de PSA, pode fornecer dados adicionais para o diagnóstico. Em suma, todos estes exames não devem ser encarados isoladamente mas sim como um todo quer no diagnóstico quer no estadiamento da doença. O diagnóstico definitivo é, obviamente,

apenas obtido com a realização de biópsia prostática trans-retal ecoguiada. Atualmente, devem ser colhidos, pelo menos, 10 fragmentos, 5 de cada lobo, em regiões padronizadas. A biópsia deve ser realizada sob anestesia local. Outros exames (tomografia computadorizada, cintilografia óssea, ressonância magnética nuclear, doseamento da fosfatase alcalina) podem também ser realizados, já com o intuito de avaliar a presença de metástases (1,6).

O tratamento para o carcinoma da próstata, de um modo geral, é diferenciado de acordo com o estágio da doença. No tratamento do cancro da próstata localizado deve realizar-se uma terapêutica com fins curativos se o doente tiver uma esperança de vida igual ou superior a 10 anos. Dada a esperança média de vida atual, deve-se realizar este tipo de tratamentos em doentes até aos 70 anos de idade, aproximadamente. Esta idade pode ser um pouco superior em doentes com bom estado geral e sem patologia comórbida significativa. As modalidades terapêuticas atualmente disponíveis são a cirurgia (clássica ou por via laparoscópica), a braquiterapia (radição interna - aplicação de sementes radioativas de iodo ou de ouro na próstata) e a radioterapia externa. Todos estes tratamentos apresentam efeitos secundários, nomeadamente, incontinência urinária e impotência sexual. A crioterapia é também uma forma de tratamento recomendada por alguns autores. No tratamento do cancro da próstata localmente avançado tal como nas formas histologicamente mais agressivas (Pontuação de Gleason 8 a 10), a terapêutica preconizada é controversa. No momento atual, a maioria dos pacientes são submetidos a uma forma de tratamento localizado, geralmente, associado a hormonoterapia adjuvante. No cancro da próstata metastizado, a terapêutica recomendada é a terapêutica hormonal, de bloqueio androgénico, isto é, inibir a produção de testosterona. Em alguns casos, em fases tardias da doença, o tumor pode tornar-se hormono-resistente, deixando de responder à terapêutica anti-hormonal. Nestes casos, designados por hormono-refratários, é por vezes necessário recorrer à quimioterapia, nomeadamente com taxanos (1).

O seguimento do carcinoma da próstata deve ser realizado, tipicamente, de 3 em 3 meses durante o primeiro ano, dependendo do tratamento realizado. Pacientes submetidos a hormonoterapia devem ser avaliados em consultas mensais. Posteriormente, até ao quarto ano, deverão fazer-se avaliações de 6 em 6 meses e, pelo menos, uma vez por ano, a partir do quinto ano em diante. O seguimento é realizado com doseamento do PSA e DRE. Outros exames poderão

estar indicados, de uma forma individualizada. O elemento fundamental para o seguimento é o PSA.

Após a realização de prostatectomia radical, as taxas de ausência de progressão da doença atingem os 69 a 89% aos 5 anos e os 47 a 79% aos 10 anos. As taxas de sucesso da braquiterapia e radioterapia são semelhantes. As formas localmente avançadas, após a cirurgia, apresentam obviamente um pior prognóstico, sendo as taxas de não progressão de apenas 30% e 40% aos 5 e 10 anos, respetivamente. O prognóstico de doentes sob terapêutica hormonal é muito variável, variando nomeadamente em função da idade, diferenciação tumoral e patologia comórbida. A esperança de vida cai de uma forma abrupta se o tumor se torna hormono-resistente (50% aos 2 anos) (1).

Não existe atualmente qualquer estratégia de prevenção recomendada, por não estar provado que alguma proporcione uma prevenção eficaz, clinicamente comprovada em estudos e em larga escala. Alguns trabalhos apontam, no entanto, para o papel de alguns agentes na prevenção do cancro da próstata. Hábitos dietéticos específicos talvez possam reduzir os riscos de cancro da próstata. Neste sentido, recomenda-se uma alimentação com baixo teor de gordura animal (hábito comum nos países onde a incidência da doença é baixa), o consumo abundante de tomate cozido (altos teores de licopeno), e a suplementação dietética com vitamina E (800 mg/dia) e selénio (20 µg/dia) (3). Por seu lado, o doseamento do PSA aumentou significativamente o número de casos diagnosticados com doença clinicamente localizada (7).

2.1.1. Antígeno específico da próstata

2.1.1.1. Bioquímica e biosíntese

O antígeno específico da próstata é uma glicoproteína de cadeia simples (peso molecular de 30.000 daltons) que pertence à família das calicreínas tecidulares. As calicreínas são serina proteases, isto é, clivam ligações peptídicas entre os aminoácidos (a.a) das proteínas nas quais um dos a.a no centro ativo é uma serina. A transcrição do gene do PSA está regulada positivamente

pelo recetor de androgénios. A testosterona sérica, principal androgénio circulante, ao complexar-se com o recetor de androgénios, modula a expressão do gene do PSA (8).

O PSA é produzido, quase exclusivamente, pelas células epiteliais dos ductos e ácinos da glândula prostática, secretado para o seu lúmen e concentrado no plasma seminal, tendo fisiologicamente a função de liquefação do ejaculado (9).

A biosíntese do PSA inicia-se no interior celular a partir de uma preproPSA que ao clivar-se origina um precursor proteico inativo de 244 a.a. O proPSA passa para o lúmen dos ductos prostáticos onde, por ação das calicreínas hK2 e hK4 é convertido a PSA ativo com 237 a.a (Figura 6).



Figura 6- Estrutura das diferentes isoformas do PSA (8).

O PSA ativo atua no líquido seminal, clivando as proteínas semenogelinas I e II (participam na coagulação do esperma), permitindo, assim, a mobilidade dos espermatozoides. Outra parte deste PSA ativo pode atingir a circulação onde se liga rapidamente a proteínas inibidoras, fundamentalmente à ACT, α -1-antitripsina e, outra parte, pode ainda por proteólise, inativar-se, atingindo a circulação, não se complexando com outras proteínas (PSA livre) (10).

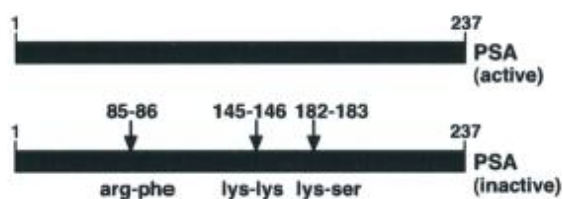


Figura 7- Proteólise do PSA. A figura indica as posições onde a forma ativa do PSA pode ser ainda clivada para gerar formas de PSA inativo (8).

Quando a membrana basal da glândula prostática está intacta, a difusão do PSA para a circulação é lenta. Na existência de carcinoma, os mecanismos de secreção estão alterados, devido, fundamentalmente, à perda de polarização da arquitetura glandular, o que leva a uma secreção direta do PSA ativo levando a uma maior formação de complexos (Figura 8).

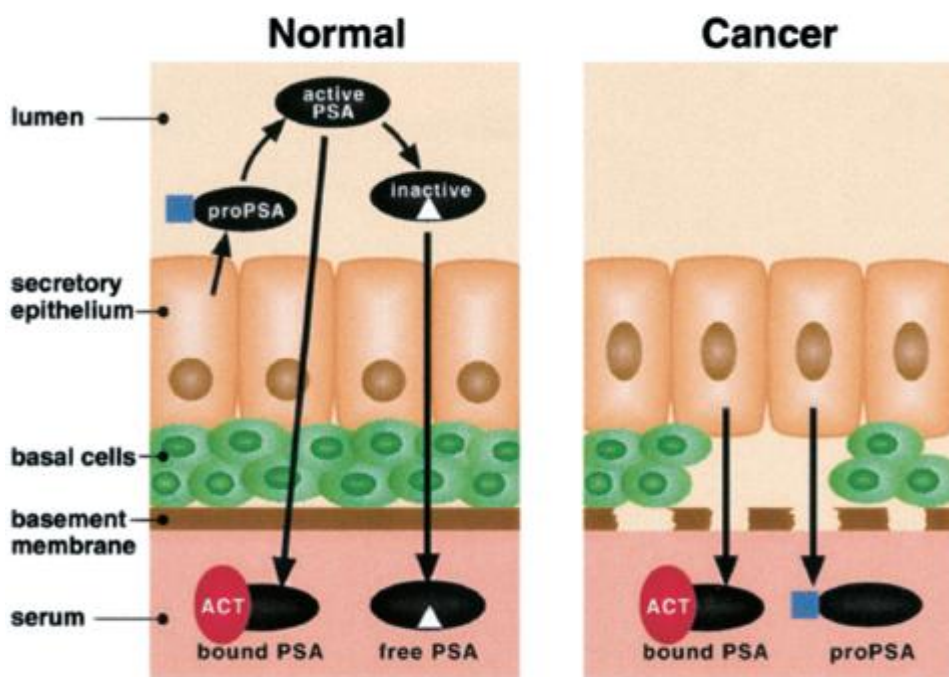


Figura 8- Modelo da biosíntese do PSA no epitélio prostático normal *versus* carcinoma da próstata (8).

2.1.1.2. Biomarcador tumoral

O marcador tumoral de maior utilidade clínica desenvolvido até ao momento é o PSA, sendo útil quer no rastreio quer nas posteriores etapas da doença cancerosa prostática, nomeadamente no diagnóstico, estadiamento e monitorização da doença (11). Embora continuem a existir casos diagnosticados apenas em fase avançada da doença, verifica-se, atualmente, um aumento significativo de casos detetados precocemente, muito em parte devido ao rastreio através do doseamento do PSA (12).

Desde 1994 que a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o doseamento do PSA para a deteção do carcinoma da próstata, definindo 4 ng/ml como limite superior do normal (12). Apesar deste valor de referência, nem sempre uma elevação do PSA significa a presença de cancro da próstata e, no inverso, um PSA inferior a 4ng/mL nem sempre poderá excluir um tumor clinicamente significativo (13).

A suspeita clínica do cancro da próstata é habitualmente levantada por alterações no toque retal ou por elevação no nível sérico do PSA. Apesar da controvérsia em relação às vantagens do diagnóstico precoce, os dados parecem favorecer essa corrente na medida em que permitirá o diagnóstico em estádios menos avançados da doença, permitindo que uma maior percentagem de homens seja submetida a terapêuticas com intenção curativa (14). Como variável independente, o PSA é o melhor preditor de cancro quando comparado com o toque retal ou a ultrassonografia trans-retal. O valor preditivo positivo do PSA é de aproximadamente 23-35% para valores entre 4 e 10 ng/ml e de 50-80% para aqueles acima de 10 ng/ml, dependendo dos achados do toque retal (9).

A avaliação do PSA tem uma sensibilidade elevada para deteção do cancro da próstata mas uma especificidade baixa, isto é, o PSA é um marcador específico de órgão mas não específico da doença, podendo estar elevado nas situações que condicionam alteração da arquitetura prostática (Hiperplasia Benigna da Próstata, prostatite, enfarte prostático) (14). Várias abordagens têm sido propostas para aumentar a especificidade, são os chamados “refinamentos do PSA”: PSA ajustado à idade (Tabela 2); densidade do PSA; velocidade do PSA; PSA livre/PSA total. A velocidade do PSA monitoriza o ritmo de crescimento dos valores de PSA. Um ritmo de

crescimento superior a 0,75 ng/ml/ano poderá ser sugestivo de carcinoma. Uma vez que, na ausência de carcinoma, existe alguma relação entre o volume prostático e o valor basal de PSA, o parâmetro densidade do PSA surge para relacionar o volume da próstata com os valores de PSA. Um dos maiores problemas de considerar um valor estático de “normalidade” do PSA (4 ng/ml) é que, por um lado, poderá não detetar 20 a 30% dos tumores de indivíduos jovens, justamente aqueles em que um diagnóstico precoce seria mais importante e, por outro lado, obriga a proceder a biópsias desnecessárias em pacientes idosos, com próstatas volumosas. Assim, hoje em dia, recomenda-se que os intervalos de valores normais sejam adaptados ao grupo etário do doente, nomeadamente descendo os limites da normalidade para valores mais baixos em pacientes jovens e, permitindo valores progressivamente mais elevados acima dos clássicos 4 ng/ml nos indivíduos mais idosos (15).

Tabela 2- Valores de PSA ajustados à idade (1).

Age (y)	PSA Normal Ranges (ng/mL)
40–49	0–2.5
50–59	0–3.5
60–69	0–4.5
70–79	0–6.5

Data from Oesterling JE et al: Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men. Establishment of age-specific reference ranges. JAMA 1993;270:860.

O “refinamento” mais recente do PSA tem sido o reconhecimento de diversas formas moleculares de PSA livre e ligado a proteínas inibidoras. Aproximadamente 90% do PSA sérico está ligado à ACT e, quantidades menores estão livres ou ligadas à alfa-2-macroglobulina. Os pacientes com neoplasia da próstata apresentam uma percentagem menor de PSA livre que os pacientes com doença benigna (1). A utilização deste teste permite evitar a realização de biópsia prostática num número significativo de doentes, sem aparente significativa perda da sensibilidade de deteção de carcinomas (15).

O doseamento do PSA também é útil no estadiamento da doença, principalmente, quando associado a outros exames. Vários estudos mostraram que cerca de 80% dos pacientes com valores de PSA menores que 4 ng/ml possuem tumor restrito à próstata. Por outro lado, metade dos pacientes com PSA maior do que 10 ng/ml apresentam extensão extracapsular, e a maioria dos pacientes com PSA superior a 50 ng/ml apresenta metástases para linfonodos pélvicos (11).

Na monitorização da doença, o PSA revela-se, também, de grande utilidade. Como já foi referido, o elemento fulcral para seguimento da doença é o PSA. Espera-se que um paciente submetido à prostatectomia radical apresente níveis de PSA inferiores a 0,1 ng/ml. Vários estudos demonstraram que elevações dos níveis de PSA após a prostatectomia ocorrem meses a anos antes dos sinais clínicos de recorrência, indicando persistência da doença. Após radioterapia ou sob hormonoterapia, os valores de PSA devem diminuir para níveis inferiores a 0,5 ng/ml. Espera-se que o decréscimo do PSA seja lento e gradual, ocorrendo o nadir, isto é, a menor concentração obtida, em meses até três anos após a radioterapia (11). Na deteção da recorrência da doença a *American Society for Therapeutic Radiology and Oncology* (ASTRO), definiu a recidiva bioquímica após a radioterapia como três aumentos consecutivos do PSA a partir do nadir após a radioterapia (7).

2.2. Biossensores

Um biossensor é, geralmente, definido como um dispositivo analítico que converte uma resposta biológica num sinal que pode ser processado e quantificado (16). Nas últimas duas décadas têm tido um enorme desenvolvimento. O biossensor é composto basicamente por três componentes: o elemento biológico de reconhecimento; o elemento transdutor (natureza variada de acordo com a propriedade físico-química detetada decorrente da interação com o bioreceptor) e um processador de sinal que permita a análise dos resultados (Figura 9).

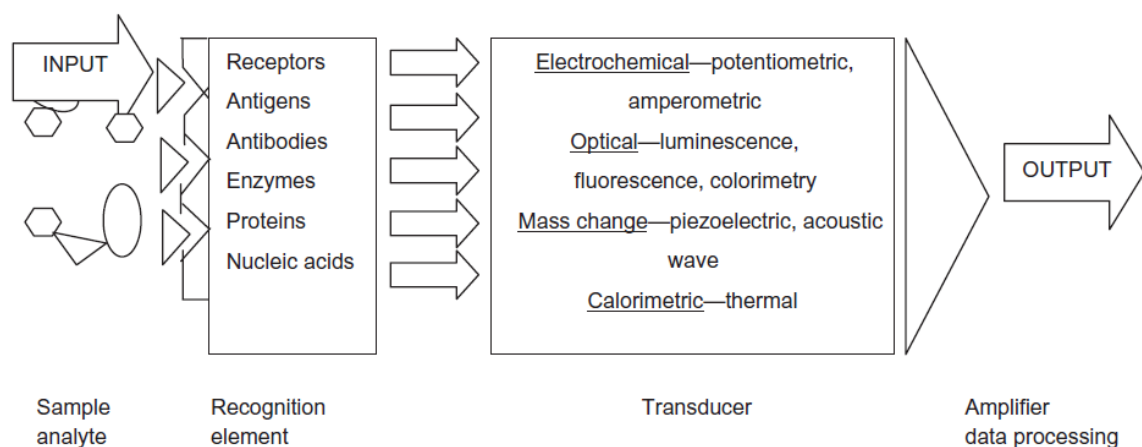


Figura 9- Representação geral de um biossensor (17).

As amostras a serem analisadas pelos biossensores podem ser desde amostras humanas (sangue, urina, saliva), alimentares, cultura de células ou amostras ambientais (16).

Um biossensor é desenhado de acordo o analito que se pretende determinar devendo ser o mais seletivo possível. A especificidade da detecção num biossensor é determinada pelo componente biológico (18). Muitas vezes, a superfície do sensor tem de ser alterada de modo a suprimir a interação com outras moléculas não específicas. Nos últimos tempos, têm sido efetuados grandes avanços científicos no sentido de encontrar modificações na superfície de sensores de modo a obter capacidades de interação específicas durante períodos de tempo prolongados (19).

2.2.1. Classificação de biossensores

Os biossensores podem ser classificados de acordo com a natureza do elemento biológico de reconhecimento, pelo seu sistema transdutor ou pela combinação de ambos.

2.2.1.1. Classificação baseada nos bioreceptores

A melhoria no desenho de bioreceptores tem sido uma das grandes apostas no desenvolvimento dos biossensores. Como já foi referido, os bioreceptores podem ser desde variadas substâncias biológicas (anticorpos, enzimas, antigénios, receptores, oligonucleótidos, etc.) até sistemas mais complexos (células, tecidos, organelos e micro-organismos). Os

bioreceptores interagem com o analito através de um mecanismo bioquímico, devendo esta interação ser a mais seletiva possível.

Nos biossensores enzimáticos, o elemento biológico é uma enzima que durante o processo de biocatálise vai produzir um sinal detetável através da formação de produtos ou do consumo de reagentes. Estes agentes de reconhecimento são os mais utilizados em biossensores devido a formarem complexos estáveis, serem bastante seletivos, possuírem resposta rápida e, também devido ao facto de o processo de obtenção de enzimas ser relativamente barato. A principal desvantagem é que podem desnaturar após imobilização. É importante para cada enzima em particular, encontrar-se um método adequado de imobilização para que se tenha uma atividade catalítica e estabilidade adequada. Um exemplo de um sensor enzimático é o famoso sensor da glicose. O elemento de reconhecimento é a enzima glicose oxidase que catalisa a oxidação da glicose, na presença de oxigénio, para produzir gluconolactona e peróxido de hidrogénio. Tipicamente, um transdutor amperométrico irá medir a diminuição do oxigénio ou a formação do peróxido de hidrogénio que serão proporcionais à concentração da glicose na amostra (17).

Os imunossensores baseiam-se na formação dos complexos antígenios-anticorpos. Estes biossensores são altamente seletivos, estáveis, sensíveis e não requerem a purificação da molécula alvo (17). O desenho e a preparação de uma interface adequada entre o elemento biológico e o material detetor são muito importantes para o sucesso deste tipo de sensores (20).

Os anticorpos ou imunoglobulinas são glicoproteínas produzidas pelos plasmócitos em resposta a substâncias estranhas ao organismo, os antígenios. Existem cinco classes de imunoglobulinas (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM), com diferentes propriedades biológicas e localizações funcionais. A característica básica da reação antígeno-anticorpo é a especificidade, representada por uma estreita relação de complementaridade entre as estruturas tridimensionais das duas moléculas. Esta complementaridade permite a aproximação máxima entre os sítios de ligação das moléculas de antígeno, os epítomos e o anticorpo. As forças de interação moleculares no complexo “antígeno-anticorpo” não são covalentes (Van der Waals, ligação eletrostática, ponte de hidrogénio ou ligações hidrofóbicas) e, embora sejam individualmente fracas, a multiplicidade das uniões leva a uma considerável energia de coesão. A dissociação do complexo antígeno-

anticorpo é reversível podendo ser feita por diversos processos (calor, modificação do pH, força iônica, solventes orgânicos (21,22). Os anticorpos podem ser utilizados como reagentes altamente seletivos em biossensores. Na detecção da concentração do antígeno ou do anticorpo, uma vez que são compostos electroquimicamente inertes, é necessário recorrer-se a outras substância electroactivas. Entre as mais comuns estão as enzimas e iões de metais (23).

Os imunoensaios de enzimas (EIAs) baseiam-se na utilização de enzimas como marcadores da reação antígeno-anticorpo. Os EIA podem ser de diversos tipos e formatos dependendo do modo como a enzima deteta e se conjuga com o complexo anticorpo-antígeno formado. Os marcadores enzimáticos mais usados são a peroxidase *horseradish peroxidase* (HRP) e a fosfatase alcalina (ALP) pois apresentam uma série de requisitos indispensáveis, nomeadamente elevada pureza, alta atividade específica, substrato estável e facilmente conjugável (24).

Os biossensores de DNA são utilizados para detetar sequências específicas de DNA. Eles apresentam um elevado grau de seletividade e afinidade uma vez que são desenhados, recebendo nesta fase o nome de sondas, de modo a hibridizar com a sequência alvo. Os sensores de DNA podem ser usados para detetar doenças genéticas, carcinomas ou infeções virais (17).

Os aptasensores baseiam-se na utilização de aptâmeros (oligonucleótidos de DNA ou RNA artificiais) que são fabricados especificamente para aderir a uma molécula particular. A principal vantagem destes biossensores advém do seu pequeno tamanho que facilita a imobilização a alta densidade (25).

Os sensores baseados em células/organelos recorrem, geralmente, a bactérias como organismo de reconhecimento. O facto de serem menos sensíveis à inibição por outros compostos presentes na matriz, serem mais tolerantes a variações de pH e temperatura são uma mais-valia. No entanto, o tempo de resposta tende a ser mais demorado e podem ser menos seletivos devido aos variados processos metabólicos que ocorrem dentro de uma célula viva (26).

2.2.1.2. Classificação baseada no tipo de transdutor

Os avanços nos métodos de transdução estão intimamente ligados com o desenvolvimento nas áreas da eletrônica e informática. Existem diferentes tipos de transdutores dependendo do tipo de propriedade físico-química que é detetada (transferência de eletrões, variação de massa, transferência de calor). A escolha do tipo de transdutor depende do material biológico utilizado e das propriedades da amostra a analisar. As quatro grandes classes de transdutores são: eletroquímicos (electrólise de espécies que sofrem oxidação-redução) óticos (medida da luminescência ou fluorescência), piezoelétrico (alteração de massa e/ou microviscosidade) e térmicos (absorção ou emissão de radiação eletromagnética).

Os biossensores eletroquímicos são os mais comuns talvez devido à sua grande versatilidade. Atualmente, o seu desenvolvimento é uma das áreas de maior e mais rápido crescimento dentro da Química Analítica. O princípio básico deste tipo de sensores é o fluxo de eletrões entre uma espécie electroactiva e a superfície de um eléctrodo (submetido a um padrão pré-definido de potencial fixo ou variável). A corrente resultante pode ser medida através de diferentes técnicas eletroquímicas. De acordo com a natureza da transdução, os dispositivos eletroquímicos utilizados podem ser potenciométricos, voltamétricos, amperométricos ou impedimétricos. Devido à sua alta sensibilidade, especificidade, análise rápida e exata, estes transdutores eletroquímicos deram um grande impulso no desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico (27).

Os transdutores óticos têm por base os desenvolvimentos surgidos na área dos raios laser, dos fotodetetores e das fibras óticas. Estas últimas permitiram uma maior flexibilidade e miniaturização deste tipo de transdutores. Fluorescência espectroscópica, absorção espectroscópica e luminescência espectroscópica são algumas das técnicas aplicadas nos transdutores óticos.

O efeito piezoelétrico é a capacidade de alguns cristais gerarem corrente elétrica por resposta a uma pressão mecânica. Esta pressão mecânica pode ser provocada pela massa do material adsorvido na superfície do transdutor.

No caso dos sensores térmicos, o calor envolvido nos processos químicos é mensurado através de termistores e, daí, se poder comparar a quantidade da substância a analisar com o calor produzido ou absorvido (17).

2.2.2. Voltametria

A voltametria é uma técnica utilizada na análise qualitativa e quantitativa de qualquer composto químico que seja eletroativo, isto é, que possa ser oxidado e/ ou reduzido. Com esta técnica podem ser efetuados estudos fundamentais de processos de oxidação e redução em vários eletrólitos, processos de adsorção em diferentes materiais, e mecanismos de transferência eletrônica em superfícies de elétrodo modificados quimicamente. Esta técnica baseia-se no registo de curva de corrente-potencial (voltamograma) obtidas pela eletrólise de uma espécie em que a intensidade de corrente que flui através de um elétrodo é medida em função do potencial aplicado a esse elétrodo. O potencial (E) é aplicado em forma de varrimento, isto é, varia a uma velocidade constante em função do tempo. Os sistemas voltamétricos assentam na utilização de potenciostatos que servem para controlar o potencial aplicado ao elétrodo de trabalho e permitem a medição da intensidade de corrente que se estabelece numa célula eletroquímica constituída por três elétrodo (Figura10).

- **Elétrodo de trabalho**, de área superficial reduzida, onde ocorrem os fenómenos eletroquímicos que se pretendem estudar.
- **Elétrodo de referência**, usado para controlar com rigor o potencial imposto ao elétrodo de trabalho.
- **Elétrodo auxiliar ou secundário**, utilizado para completar o circuito elétrico por onde circula a intensidade de corrente resultante.

Na célula eletroquímica, a corrente passa entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar, evitando que ocorram distúrbios no eletrodo de referência de modo a este assegurar o seu papel sem interferências, que é o de manter o seu potencial constante durante as medidas. O facto da área do eletrodo trabalho ser menor faz com que o eletrodo de trabalho se polarize, isto é, assumo o potencial que lhe é aplicado. O eletrodo de referência, por possuir uma área grande não se polariza, mantendo o seu potencial constante.

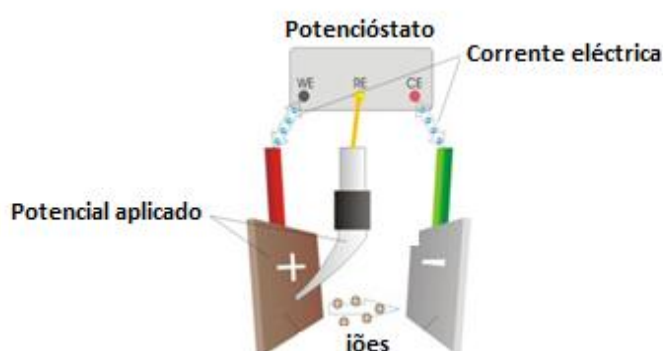


Figura 10- Representação esquemática de uma célula eletroquímica com três eletrodos: eletrodo de trabalho (WE); eletrodo de referência (RE); eletrodo auxiliar (CE).

A voltametria compreende um grupo de técnicas eletroanalíticas em que os fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente a essa superfície fornecem informações sobre o analito. Estas informações são obtidas por meio da medição da magnitude da corrente elétrica que surge no eletrodo de trabalho ao ser aplicada uma diferença de potencial entre um eletrodo de trabalho e um eletrodo auxiliar, sob condições de completa polarização do eletrodo de trabalho. A corrente resultante é constituída por duas componentes: a corrente faradaica (corrente relativa à reação de oxidação-redução da espécie em estudo) e a corrente residual. Esta corrente residual pode ser devida a uma corrente faradaica gerada pela presença de impurezas nos eletrodos, reagentes usados ou pela presença de O_2 dissolvido no meio e por uma corrente capacitiva, relacionada com cargas e descargas que podem existir sob o eletrodo de trabalho. A interferência do O_2 pode ser eliminada através do desarejamento da solução, borbulhando um gás inerte de elevada pureza.

Uma vez que o potencial no eléctrodo de trabalho varia com o tempo, surge o termo sinais de excitação, que são funções potencial-tempo, representando a variação do potencial ao longo do tempo (28).

A escolha do eléctrodo é importante para o desempenho da técnica voltamétrica, nomeadamente na construção de biossensores. Atualmente, o desenvolvimento de eléctrodos de trabalho quimicamente modificados veio minimizar várias limitações que os sensores eletroquímicos, tradicionalmente, apresentavam, nomeadamente, a passivação gradual da sua superfície, a cinética de transferência de electrões entre os analitos e os materiais dos eléctrodos ser demasiado lenta e a dificuldade em discriminar entre compostos alvos que possuam características de oxidação-redução similares (29). Entre os suportes metálicos mais utilizados para a construção de sensores eletroquímicos, o ouro merece destaque, possibilitando efetuar trabalhos em ampla faixa de potencial na região positiva, permitindo o controlo e a modificação da sua superfície de trabalho bem como o facto de apresentar elevada pureza (30).

A escolha da técnica voltamétrica está relacionada com o tipo e a qualidade de informação quantitativa e/ou qualitativa que se quer obter a respeito do analito ou do processo que envolve a interação entre o analito e o eléctrodo de trabalho. Em seguida, serão feitas resumidamente algumas considerações teóricas sobre as técnicas de voltametria cíclica e de voltametria de onda quadrada.

2.2.2.1. Voltametria cíclica

Na voltametria cíclica, parte-se de um determinado potencial e faz-se o varrimento de uma determinada gama de potenciais. Depois inverte-se o sentido, ou seja, efetua-se o varrimento no sentido inverso da mesma gama de potenciais. O ponto de partida e de chegada são o mesmo. A corrente é excitada na forma triangular (Figura 11).

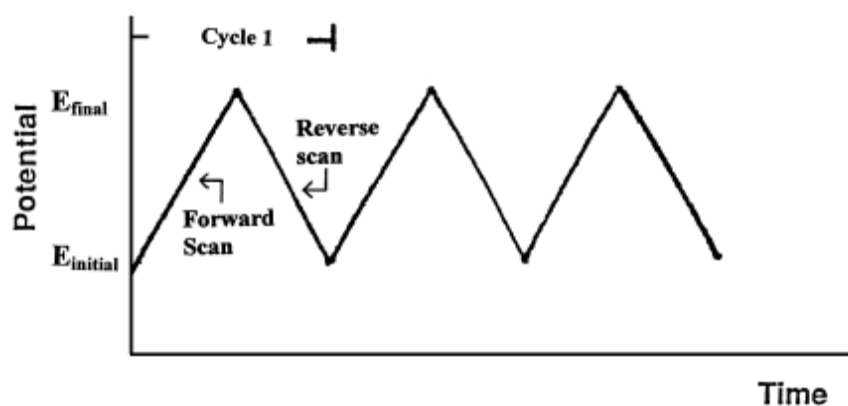


Figura 11- Sinal de excitação em voltametria cíclica (31).

Nesta técnica, realiza-se o varrimento de potencial direto e inverso em vários ciclos sucessivos observando-se a oxidação e/ou a redução da espécie electroactiva (Figura 12). Os parâmetros mais importantes num voltamograma desta técnica são os potenciais de pico catódico e anódico e as intensidades de corrente do pico catódico e anódico. A principal aplicação deste tipo de técnica é na análise qualitativa de processos eletroquímicos.

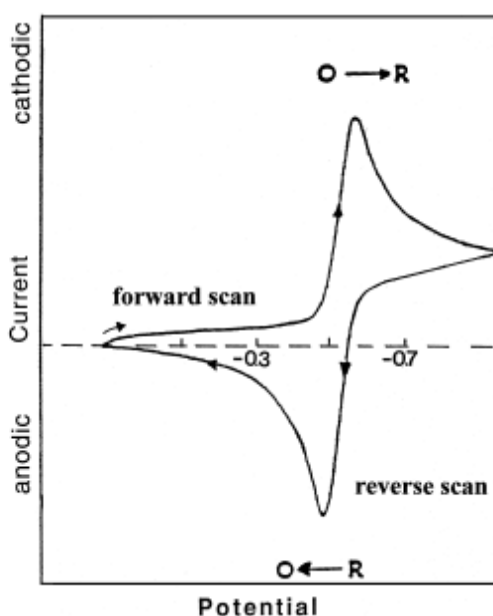


Figura 12- Voltamograma cíclico típico para sistema reversível (31).

2.2.2.2. Voltametria de onda quadrada

A utilização de técnicas voltamétricas na análise de moléculas biológicas está intimamente relacionada com o desenvolvimento de métodos mais sensíveis. A voltametria de onda quadrada (SWV) tem sido amplamente empregada para este fim, sendo umas das técnicas eletroquímicas mais rápidas e sensíveis. Os limites de detecção podem ser comparados aos das técnicas cromatográficas e espectroscópicas. Além disso, a análise dos parâmetros característicos desta técnica também possibilita a avaliação cinética e mecanística do processo electródico em estudo.

Na SWV, o sinal de excitação é obtido através da sobreposição da sequência de impulsos com o sinal na forma de escada. A medida da corrente é feita duas vezes em cada ciclo, uma vez no fim do impulso direto e outra no fim do impulso inverso (Figura 13).

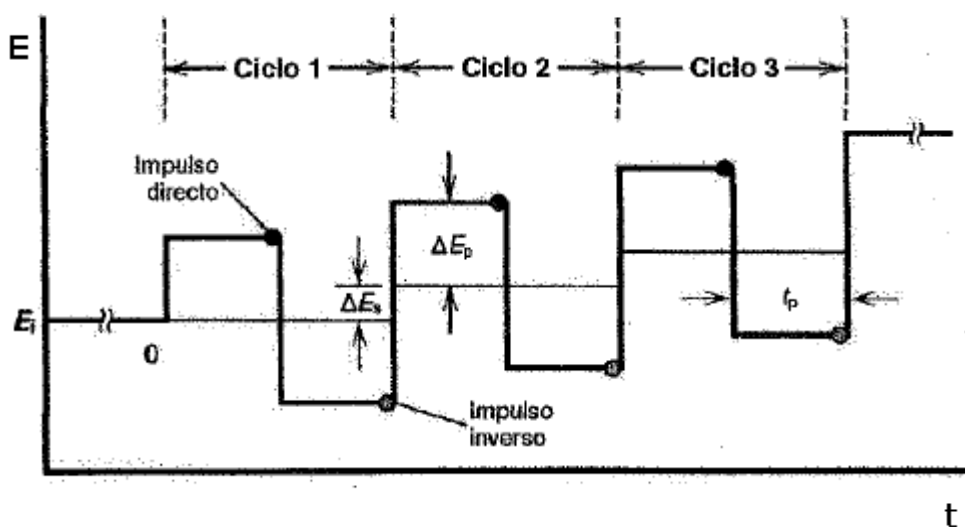


Figura 13- Esquema de aplicação do potencial e medição da intensidade de corrente ao longo do tempo na voltametria de onda quadrada (32).

No voltamograma de onda quadrada (Figura 14) observa-se a corrente resultante, que é a diferença entre as correntes diretas e inversas, e quanto maior a reversibilidade da reação maior é a contribuição da corrente inversa, aumentando significativamente a corrente resultante e, conseqüentemente, a resposta em termos de intensidade de corrente (33).

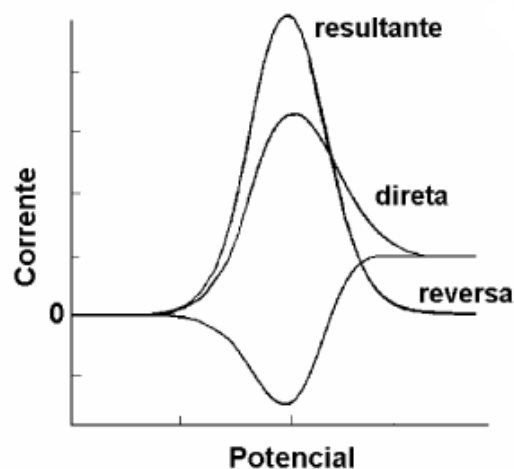


Figura 14 - Voltamograma esquemático de onda quadrada para um processo de oxidação-redução reversível (33).

Este tipo de voltametria apresenta como vantagem principal a sua elevada sensibilidade. Além disso, a utilização de altas velocidades de varrimento nas análises permite o encurtamento de tempos de análise e gradientes de concentração maiores dos que são encontrados na maioria das restantes técnicas voltamétricas (28).

2.2.3. Imobilização de biomoléculas em biossensores

A etapa fundamental no desenvolvimento de um biossensor é a imobilização e estabilização das biomoléculas sobre a superfície do transdutor com o objetivo principal de não alterar a estabilidade destes componentes responsáveis pelo reconhecimento. No biossensor, a biomolécula é vulnerável a condições de temperatura, pH e força iónica. A escolha do método de imobilização depende de vários fatores tais como a natureza do elemento biológico, o tipo de transdutor utilizado, as propriedades físico-químicas do analito e as condições de funcionamento do biossensor, conjugando todas estas variáveis de modo a obter-se o máxima de atividade do bioreceptor quando imobilizado (34). Os métodos de imobilização mais utilizados, principalmente utilizados em biossensores enzimáticos, estão descritos na tabela 3. A adsorção é um método simples de incorporação da biomolécula num suporte inerte através de interações iónicas, ligações hidrofóbicas e forças atrativas de Van der Waals. Através deste método, as biomoléculas podem ser facilmente lixiviadas para a solução por fatores como variação da força iónica, solvente e pH do meio (36). A técnica de imobilização mais utilizada tem sido a de formação de ligação covalente. A ligação é realizada quimicamente através de grupos

funcionais do material biológico, não necessário à atividade catalítica, com os grupos ativos do suporte (-OH, -NH₂, -COOH, -SH). A desvantagem está na perda de parte da atividade enzimática devido às possíveis alterações nas conformações dos sítios ativos da enzima. A ligação covalente cruzada (cross-linking) é baseada na formação de um sistema reticulado das moléculas da enzima, formando uma rede rígida. Este processo oferece a vantagem de uma ligação enzima-enzima mais sólida, porém, pode induzir a formação de barreiras de difusão, resultando no aumento do tempo de resposta do biossensor. O glutaraldeído e o álcool polivinílico com grupos estirilpiridínicos ligados são exemplos de agentes de ligação cruzada utilizados na construção de biossensores. Na oclusão, o material biológico é confinado na grade de uma matriz polimérica ou em membranas semipermeáveis, usando condições moderadas. Neste processo, uma ampla variedade de matérias pode ser avaliada e altas concentrações de biomoléculas ativas são imobilizadas. As matrizes mais utilizadas são as gelatinas, poliacrilamida, colagénio, triacetato de celulose, alginato entre outros. Teoricamente, este tipo de imobilização pode ser aplicado a qualquer biocomposto, porém podem ocorrer problemas relacionados à lixiviação dos elementos biológicos de reconhecimento para a solução devido aos diferentes tamanhos dos poros dos polímeros ou membranas, além de impedimentos estéricos para o substrato interagir com a biomolécula quando os poros das matrizes são menores que as moléculas (36,37).

Tabela 3 -Principais métodos de imobilização de biomoléculas em biossensores.

ADSORÇÃO	
LIGAÇÃO COVALENTE	
LIGAÇÃO COVALENTE CRUZADA	
OCLUSÃO	

2.2.3.1. Monocamadas auto-organizadas

Os procedimentos anteriormente discutidos, apesar de métodos de imobilização bastante utilizados, são artifícios que normalmente produzem uma superfície altamente desorganizada, com as biomoléculas orientadas aleatoriamente, provocando mudanças conformacionais que afetam a atividade funcional do componente bioativo. Assim, somente uma pequena percentagem das biomoléculas na superfície sensora permanece ativa e mantém a capacidade de interagir seletivamente com as espécies de interesse analítico (38). Além disso, torna-se difícil controlar a arquitetura molecular da camada de reconhecimento bem como discutir o mecanismo de transferência de elétrons e suas propriedades (29).

Atualmente, a formação de monocamadas auto-organizadas, “*self-assembled monolayers*” (SAM) tem sido uma alternativa bastante atrativa de procedimento de modificação de superfícies eletródicas para a imobilização de material biológico, devido à sua simplicidade,

versatilidade e possibilidade de produzir estruturas altamente ordenadas. A utilização de SAM tem crescido intensamente nas últimas décadas (39).

As monocamadas auto-organizadas empregam camadas monomoleculares que exibem uma alta organização e que são formadas espontaneamente como consequência da adsorção da imersão de uma superfície sólida (Au, Ag, Cu) em solução constituída por moléculas anfóteras (derivados alquil, álcoois, aminas e tióis). A adsorção das moléculas anfóteras também pode ser feita por deposição em vapor, todavia neste caso o controlo da estrutura é mais difícil. O grupo mais estudado e utilizado para a formação de SAM são os tióis sobre superfícies de ouro (29). A automontagem de tióis no ouro deve-se à forte interação química entre o átomo de enxofre (S) e a superfície do ouro (40).

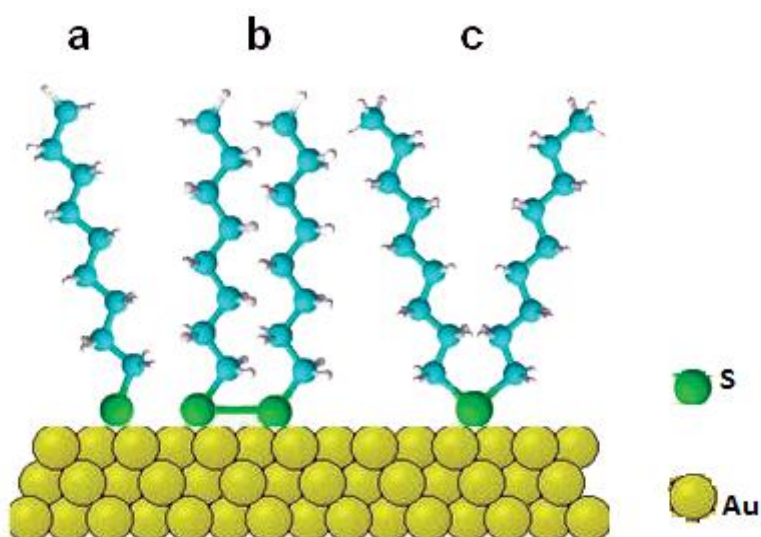


Figura 15- Representação esquemática de compostos orgânicos de enxofre usados na formação de monocamadas auto-organizadas em superfícies de ouro: (a) alcanotiol, (b) dialquildissulfeto (c) dialquilsulfeto (40).

Esta primeira interação entre o ouro e o átomo de enxofre ocorre de forma rápida. Numa segunda etapa, mais lenta, verifica-se a organização da camada sobre o substrato através de interações intermoleculares Van der Waals entre as cadeias carbônicas e as moléculas de tiol (41).

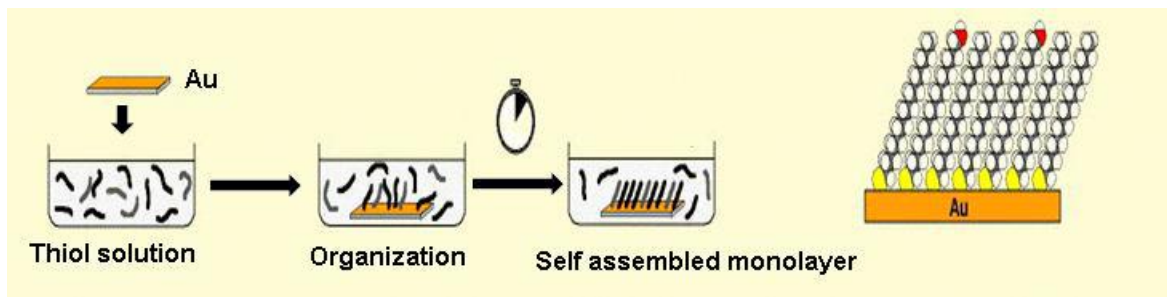


Figura 16- Formação de monocamadas auto-organizadas no ouro.

A molécula de alcanotiol (Figura 17) é constituída por três partes: o grupo cabeça, constituído pelo enxofre (S) que interage covalentemente com o substrato; a cadeia hidrocarbonada de diferentes comprimentos que estabilizam a SAM através das interações Van der Waals; e o grupo terminal, com diferentes grupos funcionais, destacando-se os grupos funcionais -COOH e -NH_2 . Na figura 17, pode-se verificar o emparelhamento perfeito entre o alcanotiol (típica inclinação de 30 graus em relação à normal da superfície) e o retículo do ouro resultando numa estrutura altamente ordenada (29,42).

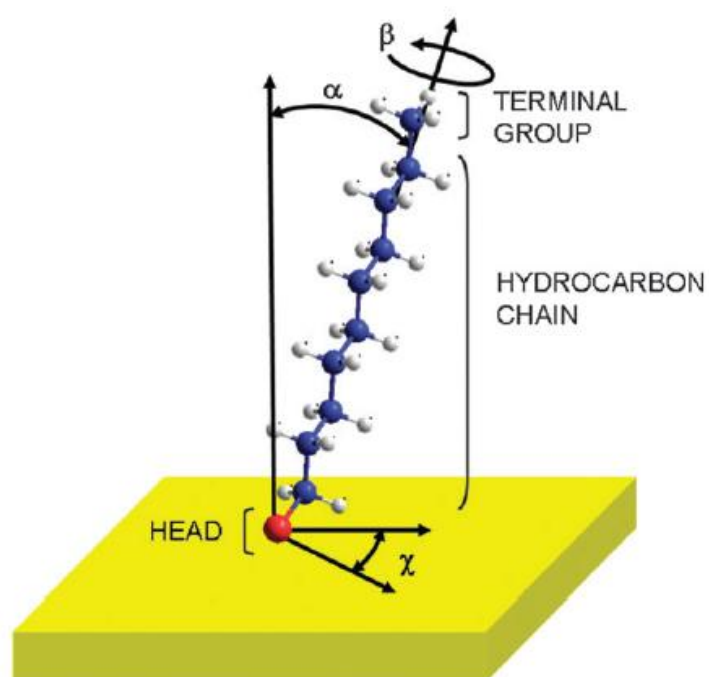


Figura 17- Representação de um alcanotiol sobre a superfície do ouro (42).

O comprimento da cadeia carbônica dos alcanotióis pode influenciar na formação da SAM. Assim, dependendo do comprimento das cadeias, as monocamadas podem variar de altamente densas, para cadeias longas, superiores ou iguais a 10 carbonos, a pouco densas e parcialmente desordenadas, com cadeias curtas (40). A utilização de SAM mistas pode ser útil para diminuir o impedimento estérico, permitindo que mais biomoléculas possam ancorar nas extremidades das SAM (43). As monocamadas mistas podem ser preparadas por deposição simultânea ou sequencial dos seus componentes. No primeiro caso, a composição da monocamada é determinada pelas propriedades das moléculas, como comprimento de cadeia, grupo terminal e solubilidade (o tiol menos solúvel é depositado preferencialmente; comprimentos de cadeia semelhantes permitem obter uma monocamada mista mais homogênea). Na deposição sequencial, o segundo componente é incorporado numa monocamada pré-existente, por imersão do substrato noutra solução de deposição (40).

Do que foi exposto anteriormente, pode-se concluir que a utilização de monocamadas auto-organizadas apresenta várias vantagens no desenvolvimento de biossensores

nomeadamente por serem de fácil execução, serem estáveis, formarem estruturas ordenadas e, principalmente, uma vez que os compostos tiolados podem ligar-se a diferentes grupos funcionais, ser possível utilizar a monocamada como ancoramento para biomoléculas por meio de ligações covalentes, sendo que a quantidade de biomolécula necessária é mínima.

2.2.4. A nanotecnologia no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos

A nanotecnologia tem assumido um papel importante no desenvolvimento de biossensores. A utilização de materiais na escala nanométrica (em termos gerais, uma partícula é considerada nanométrica quando apresenta um tamanho inferior a 100 nm) em biossensores tem permitido aumentar a quantidade de proteínas imobilizadas na superfície do transdutor, promover a reação eletroquímica e aumentar o sinal do bioreconhecimento. A sensibilidade será o maior atributo que o uso de nanomateriais oferece na construção de um biossensor (44).

2.2.4.1. Nanopartículas de ouro

Com o desenvolvimento da nanotecnologia, a utilização do ouro na medicina, principalmente em estudos envolvendo diagnósticos e terapias do cancro, tem crescido rapidamente nos últimos anos. O ouro apresenta como grandes vantagens a sua biocompatibilidade, uma síntese relativamente simples, o controlo do tamanho das nanopartículas e a facilidade de modificação química da sua superfície (45).

A escala nanométrica confere aos materiais propriedades diferentes daquelas vistas no estado macro e microscópico. Um dos efeitos é a cor do material que varia fortemente quando os materiais atingem a dimensão nanométrica. O ouro torna-se vermelho escuro ou vinho. Esta mudança de cor também é útil para avaliar a estabilidade das nanopartículas. Através da agregação, ou seja, perda da estabilidade, a cor irá mudar (Figura 18). Este facto pode também ser útil quando se adiciona à suspensão de nanopartículas compostos que possam interagir com elas, fazendo-as agregar. A mudança de cor será um indicativo desse processo.

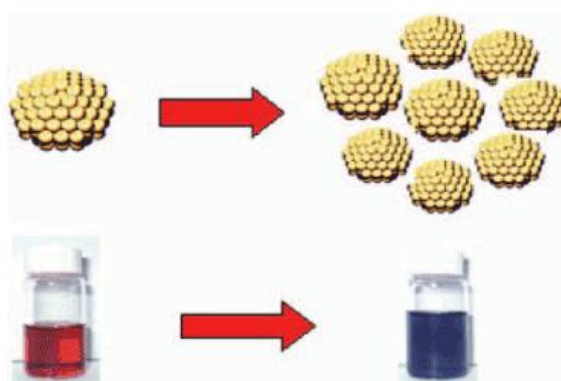


Figura 18- Mudança na coloração de uma suspensão de nanopartículas devido ao processo de agregação.

2.2.5. Biossensores para o PSA- estado da arte

A construção de biossensores para a deteção de biomarcadores tumorais tem tido bastante desenvolvimento nos últimos anos. Os biossensores, em relação às técnicas convencionais de deteção em aparelhos automatizados apresentam vantagens como o facto de serem portáteis, rápidos e económicos (46). Muitas das limitações apresentadas pelos aparelhos automatizados (Tabela 4) são ultrapassadas aquando do uso de biossensores.

Tabela 4- Limitações dos testes convencionais para a deteção do PSA (47).

Features of current PSA immunoassays	Limitations
Run on large, high-throughput analyzers	<ul style="list-style-type: none"> • High cost of analyzer and associated instrumentation • Restricted to dedicated laboratories
Testing at dedicated laboratories	<ul style="list-style-type: none"> • Requirement for sample transportation at high cost • Requirement for storage until testing • Several weeks from testing to results
Complicated technology	<ul style="list-style-type: none"> • Requirement for highly trained technical personnel • High administration costs • Many sets of reagents required, leading to high cost

Numa pesquisa da literatura, verificou-se que já existem algumas abordagens no desenvolvimento de biossensores para o antigénio específico da próstata. A tabela 5, retirada de

um artigo de revisão do ano de 2007 (47) para o desenvolvimento de biossensores para o PSA, revela já alguns trabalhos promissores com diferentes métodos de transdução e com ótimos limites de detecção.

Tabela 5- Formatos de biossensores para a detecção do PSA desenvolvidos até 2007 (47).

Examples of biosensor formats applied to PSA detection				
Signal transduction	Assay format and/or nanostructure used	Lowest detection limit	Sample volume required (μl)	Assay time (mins)
Time-resolved fluorescence	Europium (III) chelate-dyed polystyrene nanoparticles	0.21 ng/ml	20	~240
	Silica-coated terbium (III) fluorescent nanoparticles	7.0 pg/ml	45	>180
	Terbium complex-doped zirconia nanoparticles	0.4 ng/ml	45	>180
	Europium(III) nanoparticle labels and streptavidin-biotin technology	0.83 pg/ml	5	>150
SERS	Gold nanoparticles	1.0 pg/ml	40	~550
Real-time Immuno-PCR	Sandwich assay with DNA label on detection antibody	0.2 pg/ml ^a	5.5	>150
Immuno-RCA	Sandwich assay with DNA label on detection antibody	0.1 pg/ml	10	~180
Biobarcode	Gold nanoparticles	1.0 fg/ml ^b	10	80
		1.0–10.0 fg/ml	250	~210
Enzyme and/or impedance	Lateral flow immunostrip containing an electrochemical transducer	3.0 ng/ml	11	10–30
Enzyme and/or amperometric	Sandwich immunoassay on three-electrode system	0.25 ng/ml	10	60
Surface plasmon resonance	Commercial SPR biochip with signal enhancement using a sandwich-assay format	18.1 ng/ml	100	14
		1.0 ng/ml	130	6.5
		0.15 ng/ml	NS	NS
Surface plasmon fluorescence spectroscopy	Sandwich-immunoassay format on commercial SPR biochip	3 pg/ml	500	45
Electrical	Resonance frequency shift in a nanomechanical microcantilever	10 pg/ml	NS	NS
		100 ng/ml	20	60
	Surface stress bending of piezoresistive self-sensing microcantilevers	10 ng/ml	NS	10
	Conductance change in silicon nanowire sensor chip	100 fg/ml	NS	30

^aSensitivity reported by authors as 4.8×10^5 PSA molecules, converted to pg/ml for consistency; ^bsensitivity reported as 30 aM, converted to fg/ml for consistency. Abbreviation: NS, not specified by authors.

Numa pesquisa mais recente da literatura, foram encontrados mais alguns estudos nesta área (Tabela 6).

Tabela 6 - Resumo de estudos de 2008 a 2011 no desenvolvimento de biossensores para o PSA.

Transdutor	Formato do ensaio	Limite detecção	Autores
Eletroquímico	Eléktrodos <i>Screen-printed</i> incorporados em nanopartículas de tiras imunocromatográficas	0,02 ng/ml	(48)
Eletroquímico	Nanoestruturas com folhas de grafeno associadas a imunoensaio sandwich	1 pg/ml	(49)
Ótico	Microbalança de cristal de quartzo (QCM) com nanopartículas de ouro e imunoensaio sandwich	0,29 ng/ml	(50)
Ótico	<i>Paired surface plasma wave biosensor</i> (PSPWB) com imunoensaio sandwich	10 fg/ml	(51)
Eletroquímico	Micropartículas paramagnéticas -proteína G associado a imunoensaio com terceiro anticorpo marcado	1,4 ng/ml	(52)

Pelo que foi exposto conclui-se que já têm sido propostas várias abordagens no desenvolvimento de biossensores para o PSA com diferentes métodos de transdução e funcionalização de superfícies. No entanto, ainda nenhum dispositivo comercial foi desenvolvido para este biomarcador. O estudo de novos procedimentos, mais simples, rápidos, sensíveis,

económicos, é uma área que ainda merece mais desenvolvimento, sendo este o objetivo deste trabalho de investigação.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes e soluções

Solução de alumina (Al_2O_3) 0,3 μm (Gravimeta) e 0,05 μm (Gravimetra); álcool etílico absoluto (Carlo Erba); ácido sulfúrico 96% (Panreac); peróxido de hidrogénio 30%; ácido clorídrico 37% (Carlo Erba); N-Hidroxisuccinimida (NHS) (Sigma-Aldrich); 1-etil3-[3-dimetilaminopropil] cloridrato carbodiimida (EDC) (Sigma-Aldrich); 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich); cistamina (Sigma-Aldrich); ácido mercaptopropiónico (Fluka); 1,6-hexanoditiol (Sigma-Aldrich); glutaraldeído 3% (Fluka); hexacianoferrato (III) de potássio (Riedel-de-Haën); hexacianoferrato (II) tri-hidratado de potássio (Riedel-de-Haën); dihidrogenofosfato de potássio (Riedel-de-Haën); cloreto de sódio (Panreac); hidrogenofosfato di-potássio (Riedel-de-Haën); tetracloroaurato de hidrogénio (HAuCl_4) (Sigma-Aldrich); citrato de trissódiodihidratado (Riedel-de-Haën); glicina (Riedel-de-Haën) albumina sérica bovina (BSA) (Acros Organics); proteína humana de antígeno específico da próstata ab78528, 5,92 mg/ml (Abcam); anticorpo monoclonal de rato para o antígeno específico da próstata ab 10185 IgG 2a, 2mg/ml (Abcam); azoto (grau de pureza 99.999%, LINDE, Portugal).

3.2. Equipamento

As determinações voltamétricas foram realizadas num potencióstato/galvanóstato da marca AUTOLAB (EcoChimie) modelo PSTAT 12 com sistema de aquisição e tratamento de dados *General Purpose Electrochemical system for Windows* (GPES) versão 4.9. Usou-se como elétrodo de referência o Ag/AgCl, um elétrodo auxiliar de platina e elétrodos de disco de ouro policristalino com 1,6 mm de diâmetro (BASI MF-2014).



Figura 19- Potencióstato/Galvanóstato PSTAT 12 (AUTOLAB , EcoChimie)



Figura 20- Montagem eletroquímica usada.

As medições de pH foram realizadas num potenciômetro (GLP 22, Grison), com um elétrico de vidro combinado da mesma marca.

A água de elevada pureza foi obtida a partir do sistema de ultrapurificação de água Millipore Simplicity 185 (Resistividade= $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ a 25°C).

As pesagens foram realizadas numa balança analítica (Mettler Toledo), com precisão de $0,00001 \text{ g}$.

Na limpeza dos elétrodos foi utilizado um banho de ultra-sons (Crest).

O tecido de polimento utilizado como base de fricção para limpar os elétrodos (Buehler MicroCloth) é feito de fibras sintéticas (Rayon).

3.3. Procedimentos experimentais

3.3.1. Limpeza dos elétrodos

O pré-tratamento de limpeza dos elétrodos consistiu numa limpeza mecânica seguida de uma oxidação química e de um tratamento eletroquímico. Este último serviu também para confirmar a eficiência da limpeza.

O procedimento de pré-tratamento mecânico consistiu no polimento manual dos elétrodos de ouro com solução de alumina diluída utilizando tecido de polimento como base para fricção. Primeiro utilizava-se uma solução de alumina 0,3 μm seguida de uma solução de alumina 0,05 μm . A cada troca de granulometria os elétrodos eram lavados em água ultra. O polimento era realizado até que as superfícies apresentassem um aspeto espelhado. Posteriormente, os elétrodos eram enxaguados em água ultrapura e sonicados em etanol durante 5 minutos para remoção de partículas residuais de alumina da superfície electródica.

A oxidação química de possíveis contaminantes adsorvidos foi realizada por imersão dos elétrodos numa solução “piranha” (1:3 (V/V) H_2O_2 e H_2SO_4 , respetivamente) durante 5 minutos. Esta solução, fortemente oxidante, foi sempre utilizada imediatamente após ter sido preparada. Posteriormente, os elétrodos eram lavados, exaustivamente, em água ultrapura.

A etapa de polimento eletroquímico efetuou-se através da voltametria cíclica variando o potencial de -0,2 V a 1,6 V (vs. Ag/AgCl) em solução aquosa de H_2SO_4 0,5 mol/dm³ e variando a velocidade de varrimento com 25 ciclos a 0,100 V/s. Posteriormente, fez-se a limpeza eletroquímica com uma base. Esta limpeza foi efetuada por meio de 25 varrimentos cíclicos sucessivos em intervalo de potenciais de -0,2 V a -1,4 V (vs. Ag/AgCl) em solução de KOH 0.5 mol/dm³ com velocidade de varrimento 0,100 V/s.

3.3.2. Estudo de diferentes monocamadas auto-organizadas

Para o estudo da modificação dos elétrodos de ouro com monocamadas auto-organizadas, após limpeza dos elétrodos, estes foram imersos, durante 12 horas, em 200 µl de solução da SAM em estudo: SAM de cistamina 0.1 mol/dm³; SAM mista de cistamina e mercaptoetanol (100 µl cistamina 0.1 mol/dm³ + 100 µl mercaptoetanol 0.1 mol/dm³); SAM de ácido mercaptopropiônico 10⁻³ mol/dm³; SAM mista de ácido mercaptopropiônico e mercaptoetanol (100 µl ácido mercaptopropiônico 10⁻³ mol/dm³ + 100 µl mercaptoetanol 10⁻³ mol/dm³); SAM de hexanoditiol 10 mol/dm³. O solvente utilizado foi o etanol absoluto.

Após lavagem com água ultrapura, os elétrodos foram imersos, no caso das SAM com cistamina, em 100 µl de glutaraldeído 3% durante 30 minutos e, na SAM com ácido mercaptopropiônico, em 250 µl de solução de NDC/EDS (10 mg EDC+ 10 mg NHS diluídos em tampão 500 µl de PBS pH= 7.4). O procedimento para a preparação da SAM de hexanoditiol está descrito no passo 3.3.4. Em seguida, colocou-se 20 µl de solução de BSA 15 mg/ml na superfície dos elétrodos a 4°C durante 12 horas. Procedeu-se aos estudos eletroquímicos, verificando o comportamento do par eletroquímico (Fe(CN)₆)⁴⁻/(Fe(CN)₆)³⁻ numa solução de PBS 0,1 mol/dm³ pH=7,4 contendo 0,01 mol/dm³ de K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] variando o potencial de 0,6 a -0,2 V (vs. Ag/AgCl) e velocidade de varrimento a 0,199 V/s. Primeiro, fez-se uma purga com azoto durante 5 minutos.

O tampão fosfato-salino (PBS) foi preparado utilizando uma solução de K₂HPO₄ 1 mol/dm³ com 1 mol/dm³ de NaCl e uma solução de KH₂PO₄ 1 mol/dm³ com 1 mol/dm³ de NaCl, variando a quantidade destas concentrações conforme o pH pretendido.

3.3.3. Preparação de nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro foram sintetizadas através da redução química em solução do HAuCl₄ pelo agente redutor citrato de sódio. Num matraz, colocou-se 20 ml de água ultrapura e uma barra de agitação magnética. Adicionou-se 20 µl de HAuCl₄. Submeteu-se esta solução à

ebulição numa placa de aquecimento sob agitação. Posteriormente, adicionou-se em dois tempos 1 ml + 1ml de citrato de sódio 10 mg/ml com a solução em ebulição e sob agitação até que esta apresentasse a cor vermelho intenso. Deixou-se a solução a arrefecer à temperatura ambiente até posterior utilização. (53).

3.3.4. Imobilização dos anticorpos nos elétrodos de ouro

Após a etapa de pré-tratamento de limpeza dos elétrodos, estes foram imersos em 100 µl de solução etanólica de hexanoditiol durante 2 horas. Após lavagem com etanol e água ultrapura, de modo a remover adsorções físicas indesejadas (46), estes foram imersos em 200 µl de solução de nanopartículas de ouro durante 2 horas. Posteriormente, os elétrodos foram lavados com água ultrapura e tampão PBS. Foram utilizadas quatro concentrações diferentes de anti-PSA diluídas em tampão PBS 0,1 mol/dm³ pH=7,4 (5 µg/ml, 10µg/ml, 20 µg/ml, 50 µg/ml), colocando 20 µl destas soluções na superfície de quatro elétrodos diferentes, incubando-os à temperatura de 4°C durante 12 horas. Procedeu-se aos estudos eletroquímicos colocando na célula eletroquímica uma solução de PBS 0,1 mol/dm³ pH=7,4 contendo 0,01 mol/dm³ K₃ [Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] variando o potencial de 0,6 a -0,2 V (vs. Ag/AgCl) e velocidade de varrimento a 0,199 V/s. Primeiro, fez-se uma purga com azoto durante 5 minutos.

3.3.5. Incubação com o antígeno específico da próstata

Após otimização da concentração de anti-PSA a utilizar (10 µg/ml) procedeu-se a etapas em que se tentou evitar reações inespecíficas. Neste sentido, após incubação com os anticorpos, os elétrodos foram lavados com uma solução de tampão PBS 0,1 mol/dm³ pH=7,4 contendo 0,1 mol/dm³ de glicina. Posteriormente, os elétrodos foram imersos em 300 µl de solução de BSA (20 µg/ml em tampão PBS 0,1 mol/dm³ pH=7,4) durante 5 minutos à temperatura de 4°C, de modo a evitar interações inespecíficas. Após lavagem

com solução tampão PBS e efetuados estudos eletroquímicos de acordo com os parâmetros estabelecidos anteriormente, colocou-se 10 µl de determinada concentração de PSA, incubando os elétrodos durante 12 horas a 4º C. As diferentes concentrações de PSA foram diluídas em tampão PBS 0,1 mol/dm³ pH=7,4. Fizeram-se estudos voltamétricos de acordo com os parâmetros estabelecidos e procedeu-se a nova incubação com outras concentrações de PSA, após se ter removido a concentração anterior (ver passo 3.3.6.).

3.3.6. Reutilização dos elétrodos

Após as determinações voltamétricas com uma concentração de antigénio, foi testada a reutilização dos elétrodos através da imersão destes em 300 µl de uma solução de glicina 0,1 mol/dm³ pH=3 (acertado com adição de ácido clorídrico 37%), em diferentes tempos, a 4ºC para nova incubação com antigénio.

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.Pré-tratamento da superfície do ouro

Após todo o procedimento de limpeza mecânica, oxidação química e tratamento eletroquímico do eletrodo de ouro obteve-se o perfil voltamétrico mostrado na figura 21.

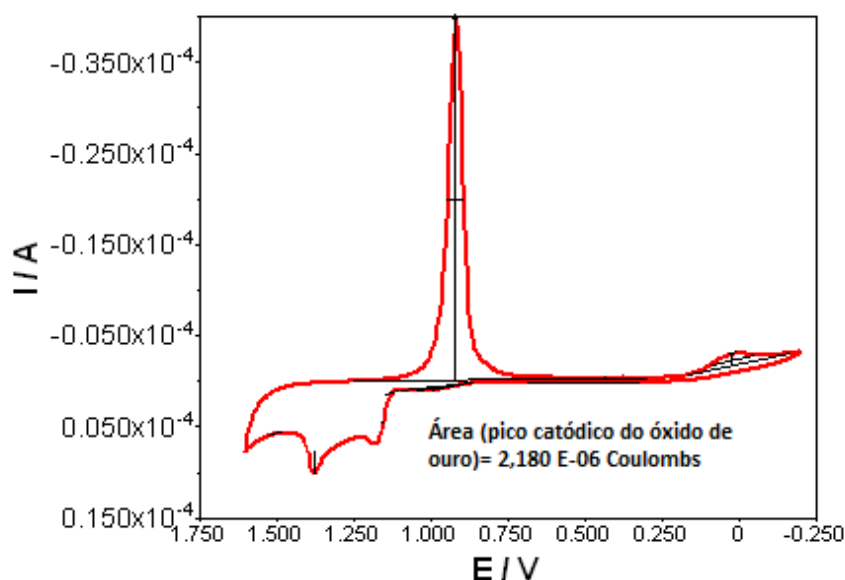


Figura 21- Voltamograma cíclico típico de eletrodo de ouro em solução aquosa de H_2SO_4 0,5 mol/dm³ a uma velocidade de varrimento 100 mV/s.

A formação de dois picos principais, um pico anódico (formação do óxido de ouro situado a 1,25 V) e um pico catódico (o óxido formado é reduzido num potencial de aproximadamente 0,90 V quando da inversão do sentido da varredura) está de acordo com outros voltamogramas citados na literatura para confirmação da limpeza de eletrodo de ouro (54).

4.2. Determinação da área real do eletrodo de ouro

Os eletrodos de ouro utilizados neste trabalho possuem uma área geométrica de $0,00251 \text{ cm}^2$. A área real do eletrodo de ouro foi calculada através do voltamograma cíclico em solução aquosa de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol/dm}^3$ variando o potencial de $-0,2$ a $1,6 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl) e velocidade de varrimento 100 mV/s (Figura 21) pela integração do pico catódico durante a redução do óxido de ouro. A carga necessária para a redução de uma camada de óxido quimicamente adsorvido sobre a superfície do ouro policristalino foi considerada como sendo $390 \text{ } \mu\text{C/cm}^2$ para efeitos de cálculo. A média da área real dos eletrodos de ouro utilizados neste trabalho foi de $0,00545 \text{ cm}^2$. Este resultado está de acordo com outros estudos que comprovam que o pré-tratamento dos eletrodos de ouro aumenta a área do eletrodo. A área real do eletrodo acaba por ser sempre maior que a área geométrica (55).

4.3. Caracterização das monocamadas auto-organizadas

A utilização de eletrodos de ouro modificados por monocamadas auto-organizadas oferece grandes vantagens em função das suas propriedades, nomeadamente, a possibilidade de se obter uma estrutura molecular ordenada e especificamente orientada, faz com que seja possível otimizar processos de complexação e/ou transferência de eletrões, fundamentais no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. Adicionalmente, a alta organização das monocamadas assegura um comportamento homogêneo em toda a superfície do eletrodo, contribuindo para a obtenção de resultados com maior sensibilidade e reprodutibilidade. Além disto, a dimensão da monocamada, que se situa na escala molecular, evita uma difusão lenta das espécies electroativas para a superfície, principalmente quando comparada com a cinética apresentada pelos eletrodos modificados com filmes poliméricos finos (56).

Vários fatores experimentais podem afetar a taxa de formação e a estrutura da monocamada auto-organizada. O etanol é o solvente mais utilizado por dissolver uma variedade de tiocompostos, com diferentes polaridades e tamanho das cadeias carbônicas, ser pouco tóxico, de pureza elevada e ter baixo custo. A concentração e o tempo de imersão também devem ser avaliados. Normalmente, baixas concentrações de tióis em solução requerem tempos maiores de imersão. A limpeza da superfície do substrato é uma etapa de grande influência na formação das monocamadas auto-organizadas. As superfícies que contêm impurezas diminuem a adsorção dos tióis que ocorre por meio de um processo de troca. As impurezas presentes na superfície são desorvidas e trocadas pelas moléculas de tiol e, conseqüentemente, esta taxa de desorção dos contaminantes afeta a cinética de formação das monocamadas. A exposição prolongada das superfícies limpas às condições ambientais pode permitir, novamente, a adsorção de impurezas nos eletrodos. Sendo assim, a formação da SAM deve ocorrer imediatamente após a etapa da limpeza superficial (57).

Na figura 22 estão caracterizadas através da voltametria de onda quadrada, as diferentes SAM estudadas neste trabalho. Como já foi referido na parte experimental, estudou-se o comportamento eletroquímico do eletrodo de ouro modificado com diferentes SAM através do conhecido par de oxidação-redução $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. A modificação dos eletrodos com as monocamadas auto-organizadas levou a um bloqueio na transferência de eletrões e conseqüente diminuição da intensidade do pico catódico das diferentes SAM em relação ao pico catódico obtido para o eletrodo sem modificação (Au). Este facto comprova que houve adsorção das SAM na superfície do eletrodo. Verificou-se que o dissulfeto cistamina (CYS) e o alcanoditiol 1,6-hexanoditiol (HDT) foram os que mais adsorveram. No caso do 1,6-hexanoditiol a transferência eletrónica foi totalmente bloqueada, quase não se observando nenhum perfil voltamétrico. O alcanotiol ácido mercaptopropiónico teve uma adsorção fraca.

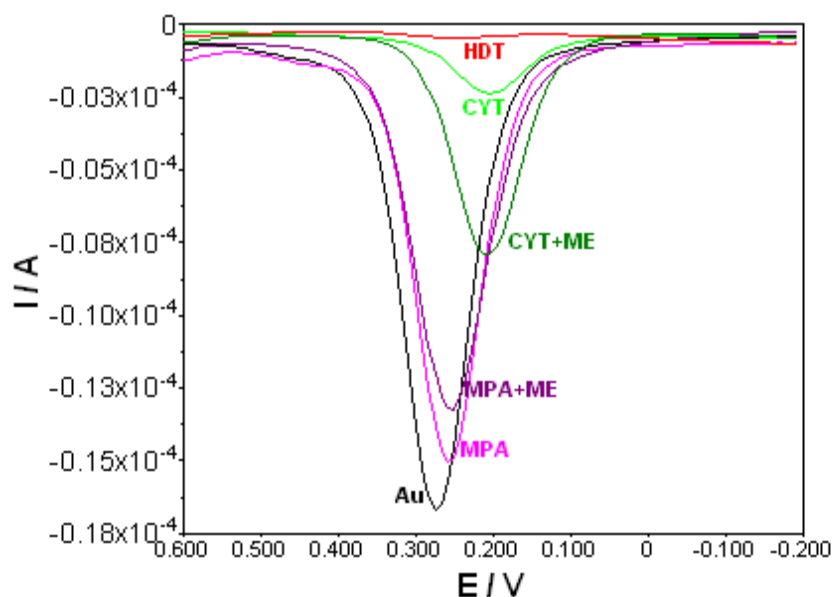


Figura 22- Comparação entre diferentes voltamogramas de onda quadrada para elétrodo de ouro sem modificação (Au) e após modificação com diferentes monocamadas auto-organizadas: SAM de cistamina (CYS); SAM mista de cistamina e mercaptoetanol (CYS+ME); SAM mista de ácido mercaptopropiónico e mercaptoetanol (MPA+ME); SAM de ácido mercaptopropiónico (MPA) e SAM de 1,6-hexanoditiol (HDT). Perfis obtidos em solução PBS 0,1 mol/dm³ pH=7,4 contendo 0,01 mol/dm³ K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] usando uma velocidade de varrimento 0,199 V/s.

No sentido de se verificar se era possível a imobilização de proteína nos elétrodos de ouro modificados com as monocamadas auto-organizadas e se a escolha do par de oxidação-redução [Fe(CN)₆]⁴⁻/[Fe(CN)₆]³⁻ era adequado para o bom desenvolvimento deste trabalho recorreu-se à proteína BSA para testar estas condições. Os grupos funcionais das monocamadas auto-organizadas foram devidamente ativados. O grupo amina (-NH₂) da cistamina foi ativado pelo glutaraldeído (agente reticulante) e o grupo carboxílico (-COOH) do ácido mercaptopropiónico por uma solução de EDC/NHS permitindo, assim, o ancoramento da BSA por meio de ligações covalentes.

Como se pode verificar pelo perfil voltamétrico observado na figura 23 houve uma significativa redução do sinal após colocação de BSA na superfície do elétrodo modificado com SAM de cistamina. O potencial de pico é observado a 0,27 V antes e após a imobilização da

proteína. O par eletroquímico $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ mostrou-se bastante sensível para a transferência eletrônica com o eletrodo de trabalho modificado com SAM e após imobilização da proteína concluindo-se, portanto, que este par electroquimicamente muito bem caracterizado é adequado para este trabalho.

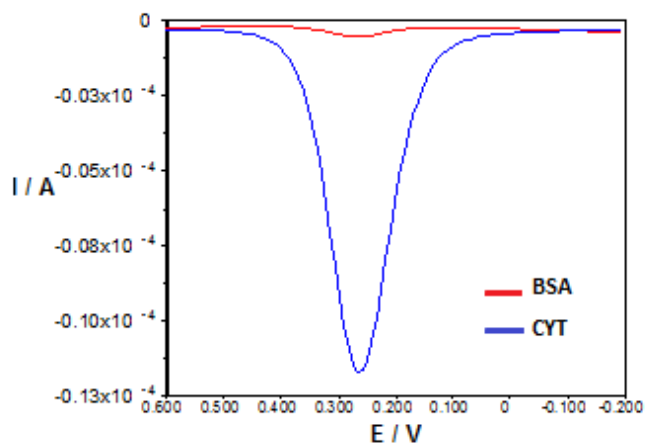


Figura 23- Perfis voltamétricos de onda quadrada obtidos para eletrodo de ouro modificado com cistamina (CYT) e após imobilização com BSA. Célula eletroquímica com solução PBS 0,1 mol/dm³ pH=7,4 contendo 0,01 mol/dm³ K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆]; velocidade de varrimento 0,199 V/s.

É interessante referir que só se conseguiu imobilizar a proteína BSA no eletrodo modificado por cistamina e hexanoditiol. Este último deve-se, como se irá ver a seguir, à utilização de nanopartículas de ouro. A não imobilização da BSA nas outras SAM poder-se-á ter devido à fraca adsorção das monocamadas na superfície do eletrodo.

4.3.1.Otimização do tempo de imersão de eletrodo de ouro em SAM de hexanoditiol

Segundo o estudo de Yang e colaboradores (58) são necessários longos períodos (36 horas) com o eletrodo de ouro imerso em solução etanólica contendo 0,001 mol/dm³ do alcanoditiol para a formação de monocamadas de 1,6-hexanoditiol compactas e organizadas.

Neste trabalho, no sentido de se otimizar a etapa de construção do biossensor, estudou-se o comportamento dos elétrodos de ouro para curtos tempos de imersão na solução etanólica do ditiol (1 e 2 horas). Como se pode verificar através da análise dos voltamogramas apresentados na figura 24, duas horas foram suficientes para bloquear totalmente a transferência eletrônica para a espécie eletroativa.

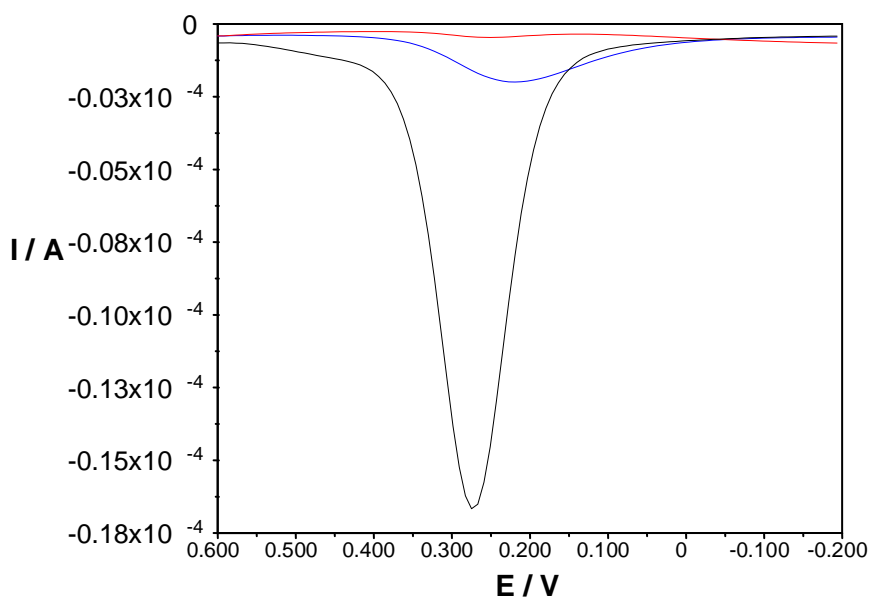


Figura 24- Voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes tempos de imersão do elétrodo de ouro em solução de hexanoditiol. Célula eletroquímica com solução PBS 0,1 mol/dm³ pH=7,4 contendo 0,01 mol/dm³ K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆; velocidade de varrimento 0,199 V/s.

4.4.Nanopartículas de ouro

Geralmente, as nanopartículas de ouro (Au-NPs) são sintetizadas por redução química em solução de um sal de Au (III) (K₂AuCl₄; HAuCl₄ ou AuCl₃) por um agente redutor (citrato de sódio, borohidrato de sódio, borohidato de potássio). A ação de um estabilizador na solução de síntese

é um fator importante tanto na proteção (prevenindo a agregação) como no controlo das propriedades das Au-NPs. A interação estabilizador/Au-NPs pode ser diversa, desde simples adsorção física a interações químicas mais fortes (adsorção química). Em certos casos, a espécie estabilizadora, que se adsorve na superfície das Au-NPs, pode ser o próprio redutor (como o citrato de sódio) ou outra adicionada no passo seguinte (polímeros, dendrímeros, tióis, surfactantes). O tamanho das Au-NPs pode ser controlado pela variação da razão estabilizador/Au. Normalmente, o tamanho das partículas diminui com o aumento da razão estabilizador/Au. A redução do HAuCl_4 por citrato de sódio em água (redutor mais fraco e estabilizador fracamente adsorvido) leva à formação de partículas de maiores dimensões, superiores a 16 nm (40).

A utilização de nanopartículas de ouro como substrato eficiente e versátil para a imobilização de anticorpos ou antígenos é comprovada não só pelo aumento da quantidade de anticorpos imobilizados na superfície do eletrodo mas também pela preservação da atividade das biomoléculas imobilizadas (59,60).

4.4.1. Estudos espectrofotométricos

As nanopartículas de ouro sintetizadas neste trabalho foram caracterizadas através de estudos espectrofotométricos UV-visível (Figura 25). De acordo com o comprimento de onda do espectro onde se observa o pico de absorvância é possível inferir do tamanho das nanopartículas de ouro (61).

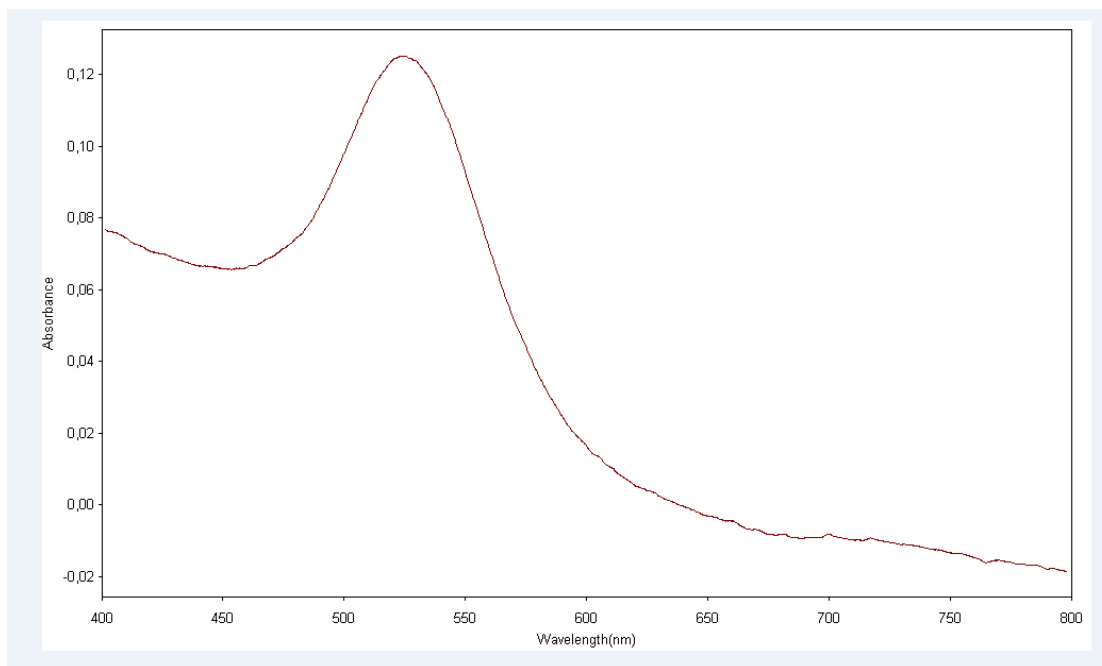


Figura 25- Análise por espectrofotometria no UV- visível para solução de nanopartículas de ouro.

Pela análise do espectro obtido entre os 400 e os 800 nm, verificou-se que a solução de nanopartículas de ouro apresentava um pico de absorvância a 522 nm. De acordo com os estudos de Stephan e colaboradores (61), para este comprimento de onda as nanopartículas de ouro formadas têm um diâmetro de 30 ± 10 nm.

4.4.2. Estudos voltamétricos

Geralmente, a imobilização de nanopartículas de ouro num elétrodo pode ser feita através de eletrodeposição ou através de interações covalentes e eletrostáticas com monocamadas auto-organizadas com grupos funcionais adequados. Um dos métodos bastante utilizados tem sido o uso de monocamadas auto-organizadas de alcanoditióis. A imersão simples do substrato de ouro em solução etanólica contendo o ditiol permite a formação de monocamadas compactas e organizadas ligadas à superfície do ouro apenas por um dos seus grupos tiol. A disponibilidade dos grupos tiol terminais nestas monocamadas permite imobilizar com sucesso Au-NPs através da interação entre o -SH livre da monocamada e a superfície da nanopartícula de ouro (Figura 26) (58, 60,62).

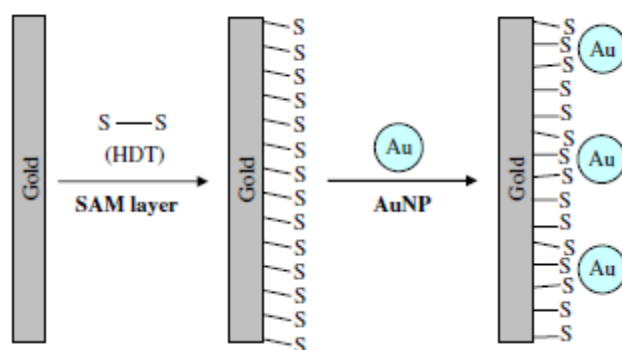


Figura 26- Modificação de elétronro de ouro com SAM de hexanoditiol e nanopartículas de ouro (60).

Neste trabalho, as nanopartículas de ouro foram imobilizadas no elétronro de ouro através de ligação covalente com o segundo grupo tiol livre da SAM hexanoditiol adsorvida no elétronro de ouro. De acordo com estudos anteriores (58,59), as nanopartículas de ouro aumentam a área real do elétronro de ouro voltando a existir uma considerável transferência eletrônica entre o $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e o elétronro de ouro. Os resultados obtidos neste trabalho estão totalmente de acordo com estes autores, como se pode observar pelos perfis voltamétricos apresentados na figura 27.

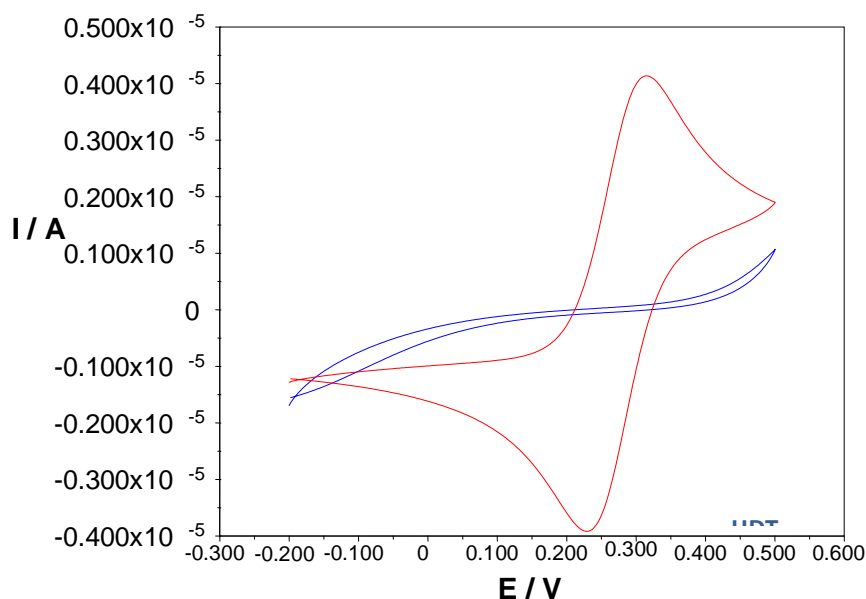


Figura 27- Voltamogramas cíclicos obtidos em elétrodo de ouro modificado com SAM de hexanoditiol (HDT) e após imersão em nanopartículas de ouro (Au-NPs). Célula eletroquímica com solução PBS $0,1 \text{ mol/dm}^3$ pH=7,4 contendo $0,01 \text{ mol/dm}^3$ $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$; velocidade de varrimento $0,05 \text{ V/s}$.

A intensidade de corrente dos dois picos obtidos neste perfil voltamétrico aumentou consideravelmente após a imobilização das nanopartículas de ouro. Esta etapa pode ser considerada o passo principal no desenvolvimento do imunossensor eletroquímico apresentado neste trabalho uma vez que possibilita a imobilização do anti-PSA no elétrodo de ouro em grandes quantidades.

4.5. Imobilização do anti-PSA

A imobilização dos anticorpos nas nanopartículas de ouro é feita através da combinação de ligações iônicas e hidrofóbicas (Figura 28) (60,63).

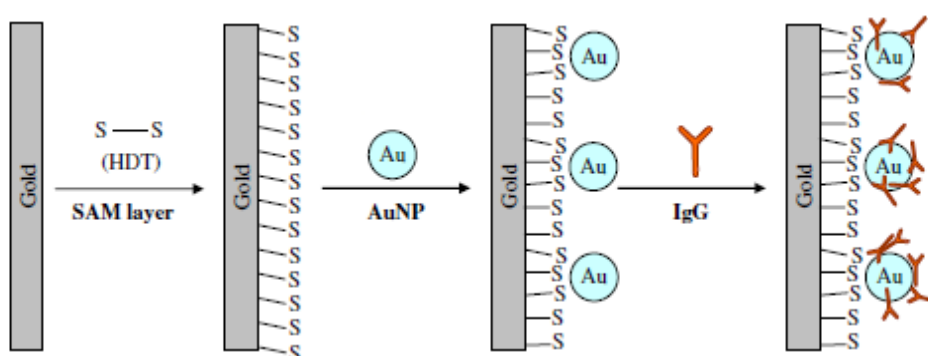


Figura 28- Representação esquemática da imobilização de anticorpos IgG em eletrodo de ouro (60).

Após a preparação de diferentes concentrações do anti-PSA (5 µg/ml-50 µg/ml), verificou-se o sinal obtido através da voltametria de onda quadrada usando o eletrodo de ouro modificado com SAM de hexanoditiol e nanopartículas de ouro (Figura 29).

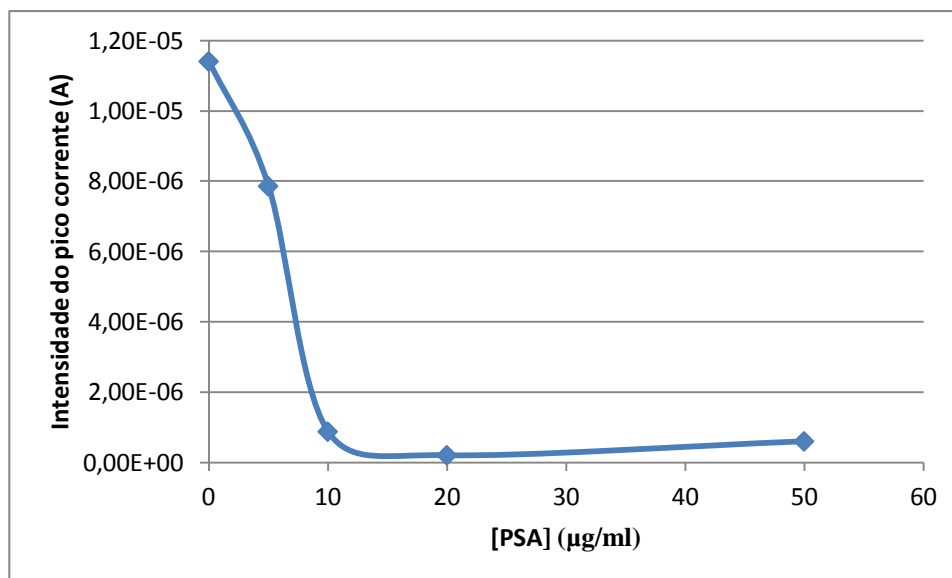


Figura 29- Intensidade de corrente do pico catódico obtida com o eletrodo de ouro modificado com diferentes concentrações de anti-PSA (voltamogramas obtidos em célula eletroquímica com solução PBS 0,1 mol/dm³ pH=7,4 contendo 0,01 mol/dm³ K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆]; velocidade de varrimento 0,199 V/s).

A imobilização do anti-PSA através das nanopartículas de ouro na superfície do eletrodo levou a um decréscimo na intensidade de corrente do pico catódico. Este decréscimo é explicado porque houve um bloqueio na transferência de eletrões entre o par eletroquímico [Fe(CN)₆]⁴⁻/[Fe(CN)₆]³⁻ e o transdutor aquando da colocação do anticorpo. Este decréscimo de intensidade de corrente é bastante significativo na concentração de 10 µg/ml de anti-PSA. A partir desta concentração verifica-se a saturação da superfície de acordo com a teoria de adsorção de Langmuir pelo que se concluiu que esta era a concentração ótima a utilizar na construção do biossensor.

4.5.1. Bloqueio de remanescentes locais reativos das nanopartículas de ouro

Como foi referido na parte experimental, após incubação do anticorpo, os eletrodos foram imersos numa solução de BSA (20 µg/ml em tampão PBS 0,1 mol/dm³ pH=7,4) a uma temperatura aproximada de 4°C durante cinco minutos. Este procedimento foi utilizado por

vários autores (49,60) com o objetivo de bloquear os remanescentes locais reativos das nanopartículas de ouro que não foram cobertos pelos anticorpos (Figura 30).

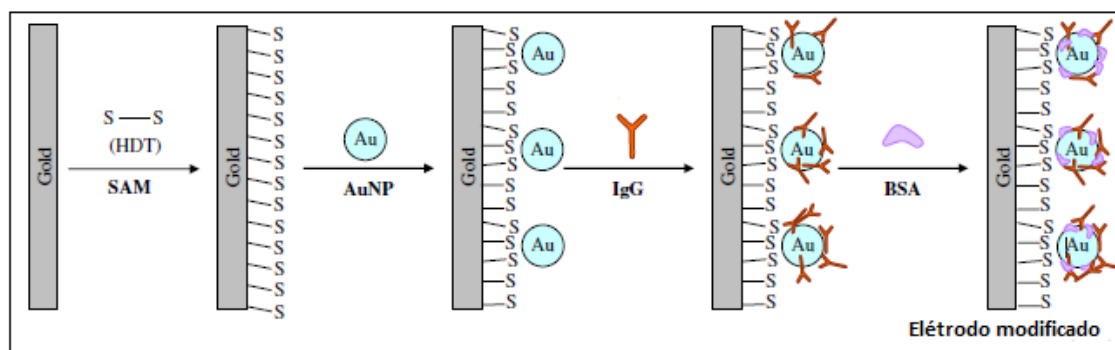


Figura 30- Modificação de elétrodo de ouro com SAM de hexanoditiol/ nanopartículas de ouro/ anti-PSA/BSA.

Tal como nos estudos dos autores citados, também neste trabalho se verificou uma diminuição na intensidade de corrente do pico (28% de redução do pico de corrente) (Figura 31). Após esta verificação, a imersão dos elétrodos em BSA foi uma etapa utilizada em todas as experiências posteriores deste trabalho de modo a evitar ligações não específicas.

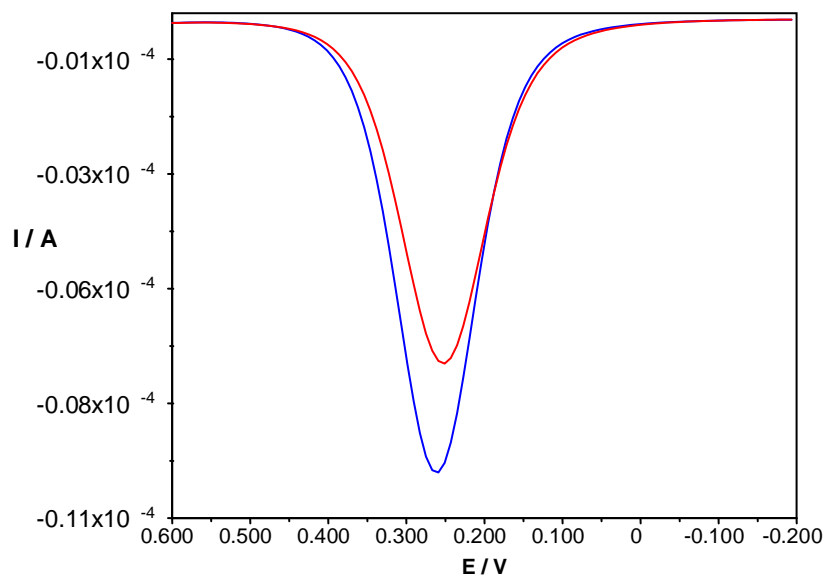


Figura 31- Voltamogramas de onda quadrada obtidos em elétrodos de ouro modificados com HDT/Au-NPs/anti-PSA 10 µg/ml e após colocação de BSA. Célula eletroquímica com solução PBS 0,1 mol/dm³ pH=7,4 contendo 0,01 mol/dm³ K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆]; velocidade de varrimento 0,199 V/s.

4.6. Detecção do antígeno específico da próstata

A formação do complexo anti-PSA com o antígeno PSA aumentou o bloqueio da transferência eletrônica entre o par eletroquímico [Fe(CN)₆]⁴⁻/[Fe(CN)₆]³⁻ e a superfície do elétrodo de ouro modificado com SAM de hexanoditiol e nanopartículas de ouro (Figura 32).

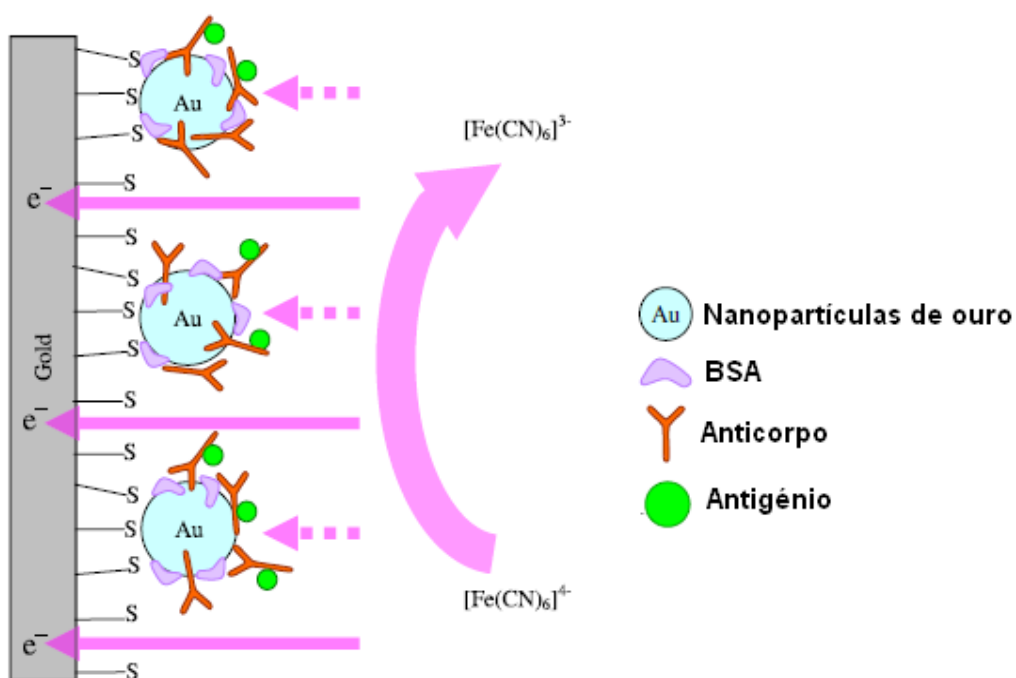


Figura 32- Esquema representativo do bloqueio de transferência de elétrons após diferentes modificações do eletrodo de ouro (60).

Através da análise dos perfis voltamétricos obtidos com diferentes concentrações de antígeno (1 e 20 ng/ml) em eletrodos de ouro modificados (HDT/Au-NPs/anti-PSA), verifica-se a diminuição da intensidade de corrente. A diminuição é maior quando a concentração de antígeno é maior (Figura 33).

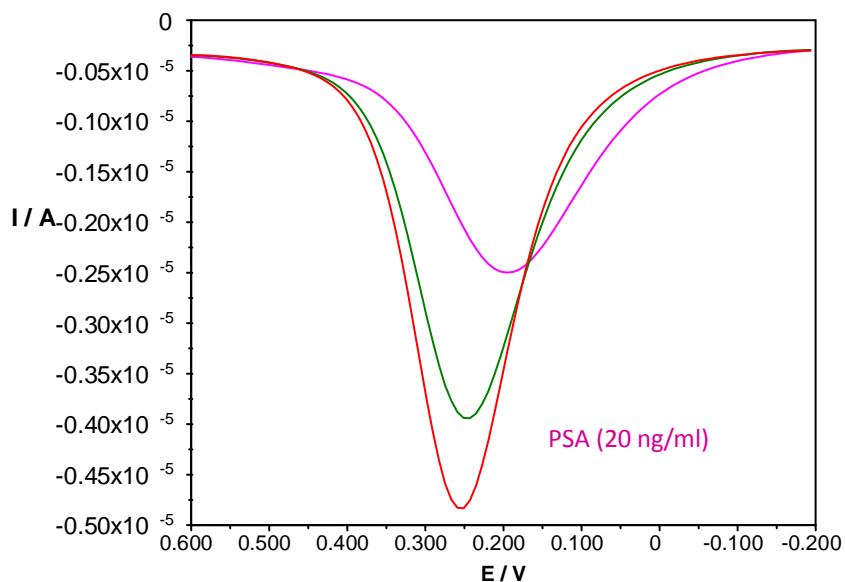


Figura 33- Perfis voltamétricos obtidos para elétrodo modificado (HDT/Au-NPs/anti-PSA/BSA) e após colocação de duas diferentes concentrações de antigénio PSA (1 e 20 ng/ml). Célula eletroquímica com solução PBS 0,1 mol/dm³ pH=7,4 contendo 0,01 mol/dm³ K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆]; velocidade de varrimento 0,199 V/s.

Na figura 34 pode-se constatar, através da análise voltamétrica cíclica do par eletroquímico $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ com as diferentes modificações do elétrodo de ouro, todo o processo de transferência eletrónica verificado neste trabalho. Após modificação do elétrodo de ouro com a SAM de hexanoditiol verifica-se um bloqueio na transferência eletrónica (Figura 34- b)). As nanopartículas de ouro restabeleceram a condutividade elétrica (Figura 34- c)). Após colocação do anti-PSA 10 µg/ml, verificou-se o bloqueio da transferência eletrónica, resultado da sua ligação às nanopartículas de ouro (Figura 34- d)). A formação do complexo anticorpo-antigénio aumentou o bloqueio da transferência eletrónica observando-se, assim uma diminuição da intensidade de corrente (Figura 34- e)).

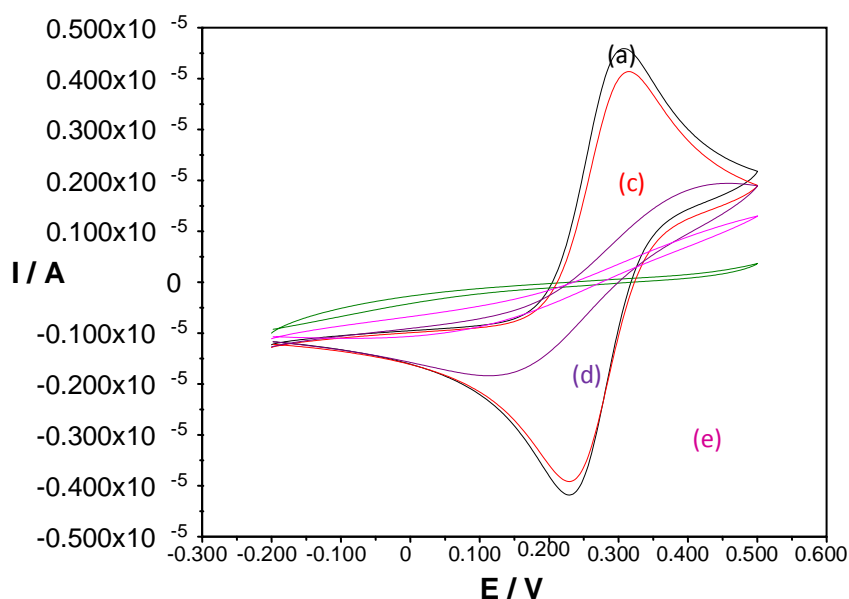


Figura 34 -Voltamogramas cíclicos obtidos com diferentes modificações do eletrodo de ouro: **a)** eletrodo de ouro sem modificação; **b)** após colocação de HDT; **c)** após colocação de nanopartículas de ouro; **d)** após colocação de anti-PSA 10 $\mu\text{g/ml}$; **e)** após colocação de PSA 20 ng/ml . Célula eletroquímica com solução PBS 0,1 mol/dm^3 $\text{pH}=7,4$ contendo 0,01 mol/dm^3 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$; velocidade de varrimento 0,05 V/s.

A capacidade de reutilização do imunossensor foi avaliada através da imersão dos eletrodos numa solução de glicina ácida (49,64) de modo a quebrar a ligação anticorpo-antígeno. Após otimização do tempo de imersão (Figura 35), 20 minutos de imersão do eletrodo em solução de glicina ácida, o eletrodo foi utilizado para detetar uma concentração de PSA igual a 10 ng/ml durante doze ciclos sucessivos. O imunossensor reteve 86% do valor inicial após estes doze ciclos com um desvio padrão relativo de 12%, confirmando-se, assim, uma adequada capacidade de regeneração deste imunossensor.

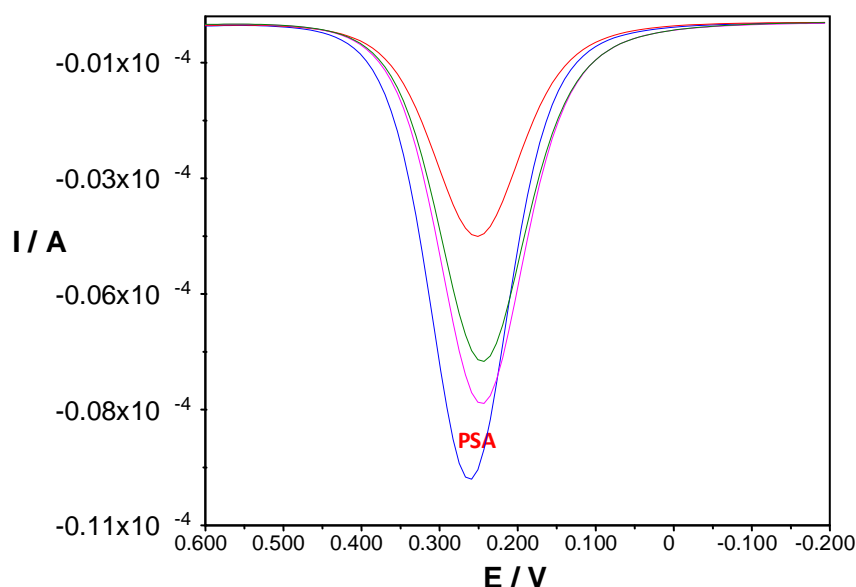


Figura 35- Voltamogramas obtidos em diferentes tempos de imersão do elétrodo de ouro em solução de glicina ácida. PSA ($c = 50 \text{ ng/ml}$); Anti-PSA ($c = 10 \text{ } \mu\text{g/ml}$). Célula eletroquímica com solução PBS $0,1 \text{ mol/dm}^3$ $\text{pH} = 7,4$ contendo $0,01 \text{ mol/dm}^3$ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$; velocidade de varrimento $0,199 \text{ V/s}$.

Os resultados de métodos analíticos baseiam-se numa curva de calibração na qual uma propriedade varia em função da concentração do analito. Neste estudo, após verificação da existência da relação intensidade de corrente/concentração do PSA determinou-se uma curva de calibração ($0,200\text{-}5000 \text{ ng/ml}$). Na figura 36 verifica-se a diminuição da intensidade do pico de corrente após colocação de diferentes concentrações de PSA no elétrodo de ouro modificado (HDT/Au-NPs/anti-PSA $10 \text{ } \mu\text{g/ml}$), resultado do bloqueio da transferência eletrónica entre o par eletroquímico $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e a superfície do elétrodo. A diminuição da intensidade de corrente foi proporcional ao aumento da concentração de PSA.

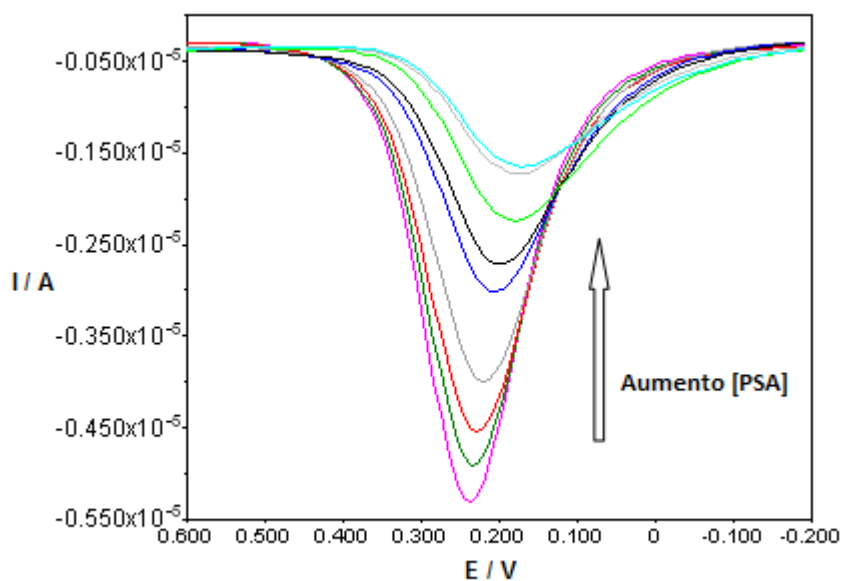


Figura 36- Perfis voltamétricos de onda quadrada obtidos para diferentes concentrações de PSA em elétrodo de ouro modificado (HDT/Au-NPs/anti-PSA 10 $\mu\text{g}/\text{m}$). Célula eletroquímica com solução PBS 0,1 mol/dm³ pH=7,4 contendo 0,01 mol/dm³ K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆]; velocidade de varrimento 0.199 V/s.

Avaliou-se a intensidade do pico de corrente numa gama de concentrações de PSA entre os 0,200-5000 ng/ml (Figura 37). Cada ponto da curva de calibração corresponde a uma média do valor da percentagem de redução do pico de corrente obtida para diferentes medições independentes efetuadas (3 ou 6 medições).

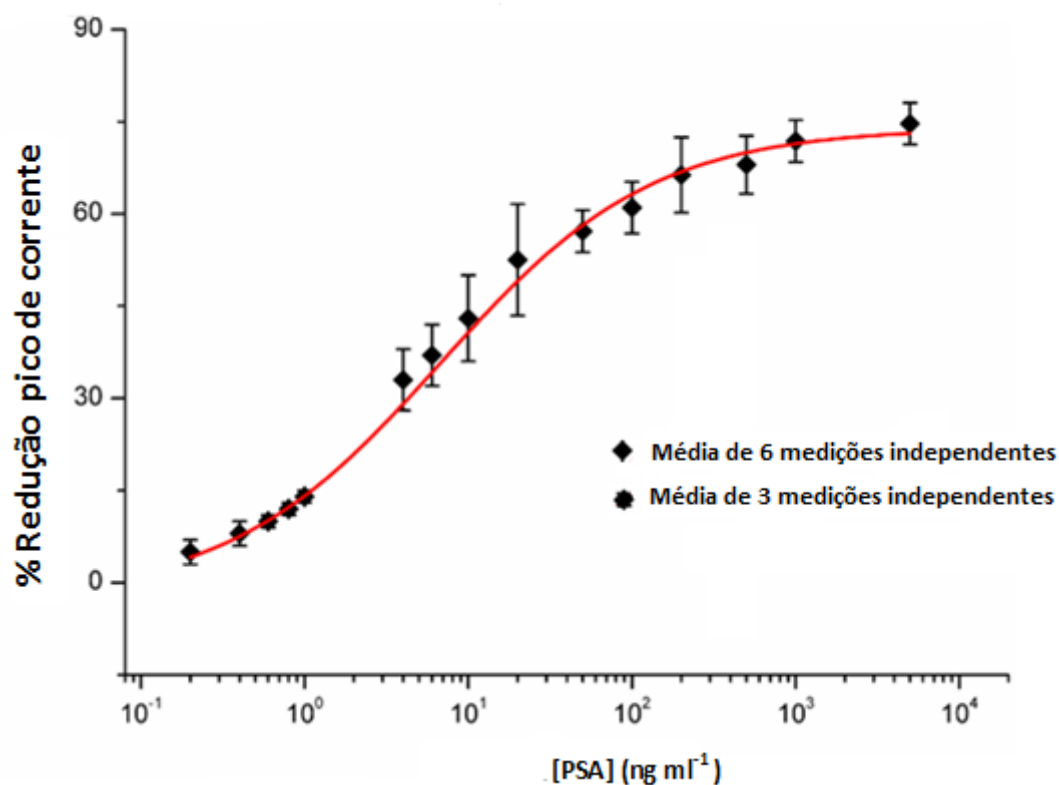


Figura 37- Curva de calibração de redução do pico de corrente (%) vs. a concentração de PSA (0,200-5000 ng/ml) obtida usando o imunossensor eletroquímico construído.

Uma vez que se estudou uma grande gama de valores, para melhor visualizar a linearidade da relação redução da intensidade do pico/aumento da concentração PSA, utilizou-se a função logarítmica numa gama de valores entre os 0,200 e os 200 ng/ml, obtendo-se a reta de regressão linear apresentada na figura 38.

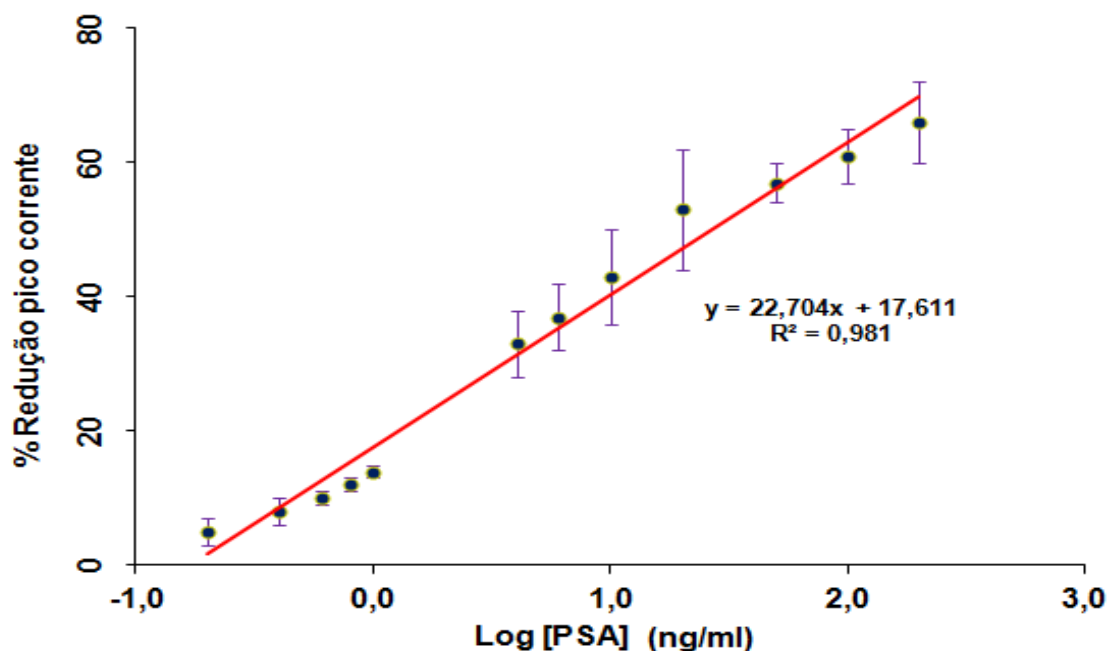


Figura 38- Regressão linear da redução do pico de corrente (%) vs. log [PSA] (0,200-200 ng/ml) usando o imunossensor eletroquímico construído.

Os resultados obtidos foram bastante satisfatórios obtendo-se uma reprodutibilidade adequada (a média do desvio padrão relativo (RDS%) em diferentes medições foi de 12%) e linearidade ($R^2 = 0,9809$). O limite de detecção (LOD) foi calculado como sendo a menor concentração de PSA cuja intensidade do pico de corrente obtida é três vezes menor que o desvio padrão da intensidade de corrente obtida na ausência do PSA sob condições idênticas (65). Obteve-se um valor de 10 pg/ml. Em comparação com estudos anteriores (48,49,50,51,52), podemos verificar que o limite de detecção obtido neste trabalho é bastante satisfatório, revelando a alta sensibilidade do imunossensor desenvolvido neste trabalho. A detecção de baixas

concentrações de PSA é útil quer na deteção precoce quer na monitorização e/ou recidiva da doença cancerosa prostática. A gama de concentrações de PSA estudadas (0,2-5000 ng/ml) inclui o valor referenciado como normal para a concentração sérica de PSA (4 ng/ml). Além disso, permite detetar também altas concentrações de PSA, o que poderá ser útil em situações de doença cancerosa prostática em que se verificam altos níveis de PSA sérico.

5.CONCLUSÃO

A imobilização de biomoléculas no transdutor, na sua forma estável e com a manutenção de suas propriedades físico-químicas de reconhecimento é um dos pontos fundamentais na construção de um biossensor. Especificamente, neste trabalho, um ponto crucial verifica-se na estabilização dos anticorpos sobre as superfícies do Au, evitando a desnaturação proteica, a reutilização, se possível, dos anticorpos e a minimização da interferência de substâncias não específicas. A utilização de nanopartículas de ouro, como já descrito em trabalhos anteriores (60) para outras biomoléculas, permitiu a imobilização de anti-PSA no eléctrodo de ouro em grandes quantidades uma vez que aumentou a área de superfície do eléctrodo de ouro. Após adsorção da SAM de hexanoditiol no eléctrodo, verificou-se um forte bloqueio da transferência eletrónica, resultado da forte adsorção desta monocamada auto-organizada no eléctrodo de ouro. Posteriormente, as nanopartículas de ouro restabeleceram a condutividade elétrica verificando-se um grande aumento na intensidade de corrente. Quando os anticorpos foram imobilizados nas nanopartículas, uma vez que não são electroativos, houve um bloqueio na passagem eletrónica. Pela mesma razão, aquando da colocação do PSA, ao interagir especificamente com o anti-PSA bloqueou, ainda mais, a transferência eletrónica. O facto da intensidade de corrente ser proporcional à concentração de PSA permitiu construir uma curva de calibração com uma linearidade de 0,200 a 200 ng/ml ($R^2 = 0,9809$), obtendo-se um limite de deteção de 10 pg. Em relação a estudos anteriores (48,49,50,51,52) este biossensor é bastante sensível, com uma metodologia simples apresentando a vantagem de não haver necessidade de recorrer a um anticorpo secundário para a verificação do sinal. Foram feitos todos os esforços no sentido de se evitar interações inespecíficas, nomeadamente pela utilização da albumina sérica bovina, que se ligou aos locais reativos remanescentes das nanopartículas de ouro, e de uma solução de tampão fosfato salino com glicina. Esta última solução permitiu bloquear sítios ativos dos anticorpos que possam reagir com substâncias inespecíficas (65). A viabilidade do imunossensor desenvolvido neste trabalho foi comprovada utilizando-se amostras de PSA com concentrações conhecidas. Seria ótimo, no futuro, aplicar-se este imunossensor a amostras reais e comparar-se os resultados com as técnicas de referência para a deteção do PSA.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1- Emil A, Tanagho JW, Aminch MC. Smith'S General Urology 17th Edition. USA:Medical; 2008
- 2- IARC- International Agency for Research on Cancer [Online]. [Acedido a 29/09/11]. Disponível em <http://globocan.iarc.fr>
- 3- POP- Portal de Oncologia Português [Online]. [Acedido a 27/09/2011]. Disponível em <http://www.pop.eu.com>
- 4- Srougi M, Ribeiro LA, Piovesan AC, Colombo JR, Nesrallah A. Doenças da próstata. Rev Med(São Paulo). 2008; 87(3): 166-177
- 5- OMS-. Organização Mundial de Saúde. [Online]. [Acedido a 27/09/2011]. Disponível em <http://www.who.int/en/>
- 6- Schoffen JPF. Câncer de Próstata: Uma Revisão da literatura. Revista Saúde e Pesquisa. 2009; 2(3): 403-410
- 7- Fonseca R, Junio A, Lima V, Lima S, Castro A, Horta. Recidiva bioquímica em câncer de próstata: artigo de revisão. Revista Brasileira de Cancerologia. 2007; 53(2): 167-172
- 8- Steven PB, Yoo-Joung K, Glenn JB. Biology of prostate-specific antigen. Journal of Clinical Oncology. 2003; 21(2): 383-391

9- Silva FC. Rastreio do cancro da próstata. Ata Urológica. 2005; 22(3): 11-13

10- Canitano F, Coniglio S, Roveto S, Barreiro D, Lafós N, Rimoldi D. Implicancia clínica del antígeno prostático específico total (PSA) en una población masculina. Revista Bioquímica y Patología Clínica. 2007; 71(1): 11-14

11- Almeida JR, Pedrosa N, Leite J, Fleming T, Carvalho V, Cardoso A. Marcadores tumorais: Revisão da Literatura. Revista Brasileira de Cancerologia. 2007; 53(3): 305-316

12- Danil M, Stacy L, Robert G, Alan P. Biomarkers for Prostate Cancer. Annual Review of Medicine. 2009; 60: 139-151

13- Associação portuguesa de Urologia [Online]. Publicado em abril de 2010. Disponível em <http://www.apurologia.pt/publico/frameset.htm>

14- Louro N, Borges R, Massó P, Silva M, Carvalho L, Moreira J, Oliveira JC, Marcelo F. Avaliação comparativa dos valores de PSA total, PSA livre/PSA total e PSA complexado na deteção do cancro da próstata. Ata Urológica. 2007; 24(1): 39-44

15- Reis J P, Ferraz J, Varela J, Romão A. Diagnóstico Precoce do Carcinoma da Próstata. Ata Urológica. 2006; 23(2): 77-83

16- Grieshaber D, MacKenzie R, Voros J, Reimhult E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. Sensors. 2008; 8: 1400-1458

17- Bohunicky B, Mousa S. Biosensors: the new wave in cancer diagnosis. Nanotechnology, Science and Application. 2011; 4: 1-10

18- Chaubey A, Malhotra BD..Mediated biosensors. Biosensors & Bioelectronics. 2002; 17(6-7): 441-456

19- Kasemo B. Biological Surface Science. Surface Science. 2002; 500(1-3): 656-677

20- Tsekenis G, Garifallou G,Davis F, Millner P, Gibson T, Higson S. Labeless Immunosensor Assay for Myelin Basic Protein based upon an AC Impedance Protocol. Analytical Chemistry. 2008; 80: 2058-2062

21- Souza E, Kubota LT, Yamamoto YI. Alguns aspetos de imunoensaio aplicados à química analítica. Química Nova. 1999; 22(6): 57-63

22- Riccardi CS, Costa PI, Yamanaka H. Imunossensor amperométrico. Química Nova. 2001; 25(2): 77-85

23- Medyantseva EP, Khaldeeva EV, Budnikov GK.Immunosensors in Biology and Medicine: Analytical Capabilities, Problems, and Prospects. Journal of Analytical Chemistry. 2001; 56(10): 1015-1013

24- Mehrvar M, Abdi M.**Recent Developments, Characteristics, and Potential Applications of Electrochemical Biosensors** Analytical Science. 2004; 20(8): 1113-1126

25- Strehlitz B, Nikolaus N, Stoltenburg R. Protein Detection with Aptamer Biosensors. Sensors. 2008; 8(7): 4296-4307

- 26-** De Angelis KM, Firestone MK , Lindow SE. Sensitive whole-cell biosensor suitable for detecting a variety of N-acyl homoserine lactones in intact rhizosphere microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007; 73(11): 3724-3727
- 27-** Ahmed M, Hossain M M, Tamiyaa E. Electrochemical Biosensors for Medical and Food. *Applications. Electroanalysis*. 2008; 20(6): 616-626
- 28-** Skoog D, West DM, Holler FJ, Crouch SR. *Fundamentos de Química Analítica*. 8ª edição. Espanha: Thomson; 2005
- 29-** Freire RS, Pessoa CA, Kubota LT. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. *Química Nova*. 2002; 26(3): 81-389
- 30-** Janata J, Josowicz M, Devaney M. Chemical sensors. *Anal. Chem*. 1994; 66: 207-228
- 31-** Wang J. *Analytical Electrochemistry*. 3 ed. New Jersey: Wiley-VCH; 2006
- 32-** Bard AJ, Faulkner L. *Electrochemical methods- Fundamentals and Applications*. New York: John Wiley & Sons; 2001
- 33-** Souza D, Codognoto L, Malagutti A, Toledo R, Pedrosa V, Oliveira R, Mazo L, Avaca L, Machado S. Voltametria de onda quadrada. Segunda parte:aplicações. *Química Nova*. 2004; 27(5): 790-797
- 34-** Singh M, Verma N, Garg AK, Redhu N. Urea biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2008; 134: 345-351

35- Nunes GS, Marty J L. Immobilization of Enzymes and Cells: Immobilization of Enzymes on Electrodes, Methods in Biotechnology. 2006; (22): 239-250

36- Marques PR, Yamanaka H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. Química Nova. 2008; 31(7): 112-123

37- Lojou E, Bianco P. Application of the electrochemical concepts and techniques to amperometric biosensor devices. J. Electrochem. 2006; 16: 79-91

38- Chaki NK, Vijayamohanan K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. Biosens. Bioelectron. 2002; 17: 1-12

39- Gooding JJ, Mearns F, Yang W, Liu J. Self-assembled monolayers into 21st century: recent advances and applications. Electroanalysis. 2003; 15(2): 81-96

40- Ferreira VC, Silva F, Abrantes LM. Monocamadas automontadas de alcanotióis-das superfícies planas à estabilização de nanopartículas de ouro. Química 111. 2008; 37-48

41- Love JC, Estroff LA, Kriebel JK, Nuzzo RG, Whitesides GM. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. Chemical reviews. 2005; 105(4): 1103-1169

42- Vericat C, Vela ME, Benitz G, Carro P, Salvarezza. Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system. Chem.Soc.Rev. 2010; 39: 1805-1834

43- Lee Jw, Sima SJ, Choa SM; Lee J. Characterization of a self-assembled monolayer of thiol on a gold surface and the fabrication of a biosensor chip based on surface Plasmon resonance for detecting anti-GAD antibody. *Biosensors and Bioelectronics*. 2004; 20: 1422-1427

44- Haruyama T. Micro and nanobiotechnology for biosensing cellular responses. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2003; 55: 393-401

45- Bhattacharya R, Mukherjee P. Biological properties of “naked” metal nanoparticles. *Adv. Drug Deliver.* 2008; 289-1306

46- Mascini M, Tombeli S. Biosensors for biomarkers in medical diagnostics. *Biomarkers*. 2008; 13(7-8): 637-657

47- Healy D, Hayes C, Leonard P, McKenna L, O’Kennedy R. Biosensor developments; application to prostate-specific antigen detection. *Trends in Biotechnology*. 2007; 25(3): 125-131

48- Lin Y, Wang J, Liu G, Vin H, Wai C. A nanoparticle label/immunochromatographic electrochemical biosensor for rapid and sensitive detection of prostate-specific antigen. *Biosensors and Bioelectronics*. 2008; 23: 1659-1665

49- Minghui Y, Alireza J, He L, Shaoqin G. Ultrasensitive immunosensor for the detection of cancer biomarker based on graphene sheet. *Biosensors and Bioelectronics*. 2010; 26: 560-565

50- Ulodag y, Tothil I. Development of a sensitive detection method of cancer biomarkers in human serum (75%) using a quartz crystal microbalance sensor and nanoparticles amplification system. *Talanta*. 2010; 82: 277-282

51- Su L, Chen R, Li Y, Lee Y, Lee C, Chou C. Detection of prostate-specific antigen with a paired surface plasma wave biosensor. *Analytical Chemistry*. 2010; 82(9): 3714-3718

52- Zani A, Laschi S, Mascini M, Marrazza G. A new electrochemical multiplexed assay for PSA câncer Marker detection. *Electroanalysis*. 2011; 23(1): 91-99

53- McFarland A, Haynes C H, Mirkin C, Duyne R, Godwin H. Color my nanoworld. *Journal of Chemical Education*. 2004; 81(4): 544

54- Angnes L, Ritcher ME, Augelli MA, Kume HG. Gold electrodes from recordable CDs. *Anal.Chem.* 2000; 72: 5503-5506

55- Carvalhal RF, Freire RS, Kubota LT. Polycrystalline gold electrodes: a comparative study of pretreatment procedures used for cleaning and thiol self-assembly monolayer formation. *Electroanalysis*. 2005; 17(14): 1251-1259

56- Mirsky VM. New electroanalytical applications of self-assembled monolayers. *Trends in Anal.Chem.* 2002; 21(6-7): 439-450

57- Mendes RK. Investigação dos efeitos dos procedimentos de imobilização de monocamadas auto-organizadas da enzima peroxidase no desenvolvimento de um biossensor. [Doutoramento] [Campinas (Br)]: Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas. 2006

58- Yang M, Zhan Z. Impediment to heterogeneous electron transfer reactions of redox-activespecies by alkanedithiol self-assembled monolayers with andwithout an adlayer of Au nanoparticles. *Electrochimica Ata*. 2004; 49: 5089–5095

59-Huang H, Liu Z, Yang X. Application of electrochemical impedance spectroscopy for monitoring allergen–antibody reactions using gold nanoparticle-based biomolecular immobilization method. *Analytical Biochemistry*. 2006; 356: 208–214

60- Lin C, Chen L, Huang C, Ding SJ, Chang C, Chang H. Development of the multifunctionalized gold nanoparticles with electrochemical –based immunoassay for protein A detection.*Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2008; 619(620): 39-45

61- Stephan L, Mostafa A. El-Sayed. Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B*. 1999; 103: 4212-4217

62- Sivanesan A, kannan P, Abraham John S. Electrocatalytic oxidation of ascorbic acid using a single layer of gold nanoparticles immobilized on 1,6-hexanedithiol modified gold electrode.*Electrochimica Ata* 52. 2007; 8118-8124

63- Chen GL. A sensitive immunosensor using colloidal gold as electrochemical label. *Talanta*. 2007; 72(5): 1800-1804

64- Katuta M, Takahashi H, Kazuno S, Murayama K, Ueno T, Tokeshi M. Development of the microchip-based repeatable immunoassay system for clinical diagnosis. *Meas. Sci. Technol*. 2006; 17: 3189-3194

65- IUPAC-International union of pure and applied chemistry. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. Pure Appl. Chem. 2002; 74(5): 835-855

66- Sarkar P, Sal PS, Ghosh D, Setford SJ. Amperometric biosensors for detection of the prostate cancer marker (PSA). International Journal of Pharmaceutics. 2002; 238: 1-9